

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in
humanen mesenchymalen Stammzellen:
Molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6**

Iris Isabella Gabriele Peröbner

aus

München

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn PD Dr. Peter Neth betreut und von Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 19.10.2012

.....

(Iris Peröbner)

Dissertation eingereicht am 19.10.2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Vollmar

2. Gutachter: PD Dr. Peter Neth

Mündliche Prüfung am 27.11.2012

*„Darin besteht das Wesen der Wissenschaft.
Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte.
Dann sieht man nach, ob es der Fall ist
und im allgemeinen ist es nicht der Fall.“*

– Bertrand Russell (1872-1970) –

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
-------------------------	---

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
----------------------------	------

A	Zusammenfassung.....	1
----------	-----------------------------	----------

B	Einleitung	3
----------	-------------------------	----------

B.1	Stammzellen.....	3
------------	-------------------------	----------

B.1.1	Embryonale Stammzellen.....	4
-------	-----------------------------	---

B.1.2	Adulte Stammzellen	5
-------	--------------------------	---

B.1.3	Mesenchymale Stammzellen	5
-------	--------------------------------	---

B.1.4	Induzierte pluripotente Stammzellen.....	7
-------	--	---

B.1.5	Stammzellen und therapeutische Ansätze	8
-------	--	---

B.2	Wnt-Signalweg.....	10
------------	---------------------------	-----------

B.2.1	Nicht-kanonische Wnt-Signalwege	11
-------	---------------------------------------	----

B.2.1.1	PCP-Signalweg.....	11
---------	--------------------	----

B.2.1.2	Wnt/Calcium-Signalweg.....	12
---------	----------------------------	----

B.2.2	Wnt/ β -Catenin Signalweg.....	12
-------	--------------------------------------	----

B.3	Signalprozesse im Wnt/β-Catenin-Signalweg.....	14
------------	--	-----------

B.3.1	Liganden des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.....	14
-------	---	----

B.3.1.1	Wnt-Familie.....	14
---------	------------------	----

B.3.1.2	Dkk-Familie	15
---------	-------------------	----

B.3.2	Rezeptoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges	16
-------	--	----

B.3.2.1	Frizzled-Rezeptorfamilie.....	16
---------	-------------------------------	----

B.3.2.1.1	Struktur der Fzd-Rezeptoren	16
-----------	-----------------------------------	----

B.3.2.1.2	Gewebe-spezifische Expression der Fzd-Rezeptoren.....	16
-----------	---	----

B.3.2.1.3	Funktion und Rolle der Fzd-Rezeptoren.....	16
-----------	--	----

B.3.2.2	Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6	17
---------	--------------------------------------	----

B.3.2.2.1	Struktur von LRP5 und LRP6	17
-----------	----------------------------------	----

B.3.2.2.2	Gewebe-spezifische Expression der LRPs	18
B.3.2.2.3	Funktion und Rolle der LRPs	18
B.3.2.3	Signaltransduktion über Fzds und LRPs	20
B.3.2.3.1	LRP-Phosphorylierung	21
B.3.2.3.2	Modelle für die Signaltransduktion	22
B.3.3	Signalweg im Cytoplasma – Modifikation von β -Catenin	24
B.3.4	Signalweiterleitung im Nukleus	26
B.3.5	Wnt-Zielgene	28
B.4	Wnt/β-Catenin-Signalweg in adulten Stammzellen	29
C	Fragestellungen und Zielsetzung	30
D	Material und Methoden	32
D.1	Material	32
D.1.1	Chemikalien und Material	32
D.1.1.1	Chemikalien und Material für die Mikrobiologie	32
D.1.1.1.1	Bakterienstämme	32
D.1.1.1.2	Chemische Substanzen	32
D.1.1.1.3	Material	33
D.1.1.1.4	Kulturmedien	33
D.1.1.2	Chemikalien und Material für die Molekularbiologie	33
D.1.1.2.1	Chemische Substanzen	33
D.1.1.2.2	Enzyme	34
D.1.1.2.3	Kits	34
D.1.1.2.4	Material	34
D.1.1.2.5	Oligonukleotide für Plasmidkonstruktionen	34
D.1.1.2.6	PCR-Primer	35
D.1.1.2.7	Pufferlösung für die Agarose-Gelelektrophorese	35
D.1.1.3	Chemikalien und Material für die Proteinbiochemie	35
D.1.1.3.1	Antikörper	35
D.1.1.3.2	Chemische Substanzen	36
D.1.1.3.3	Kits	36
D.1.1.3.4	Material	36
D.1.1.3.5	Pufferlösungen	37

D.1.1.4	Chemikalien und Material für die Zellbiologie	38
D.1.1.4.1	Chemische Substanzen.....	38
D.1.1.4.2	Material.....	38
D.1.1.4.3	Medien.....	38
D.1.1.4.4	Rekombinantes Protein.....	39
D.1.1.4.5	siRNAs	39
D.1.1.4.6	Zellen.....	40
D.1.2	Datenbanken.....	40
D.1.3	Geräte.....	40
D.1.4	Software.....	42
D.1.5	Vektoren	42
D.1.5.1	Klonierungsvektoren.....	42
D.1.5.2	Überexpressionsvektoren.....	44
D.2	Methoden.....	49
D.2.1	Mikrobiologie.....	49
D.2.1.1	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Stämme	49
D.2.1.2	Transformation chemisch kompetenter E. coli-Stämme	49
D.2.1.3	Stammhaltung von E. coli.....	49
D.2.1.4	Kultivierung von E. coli.....	50
D.2.2	Molekularbiologie	50
D.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
D.2.2.2	TOPO-TA Klonierung	51
D.2.2.3	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	51
D.2.2.4	Elution von DNA aus Agarosegel.....	52
D.2.2.5	Restriktion von DNA	52
D.2.2.6	Klenow-vermittelte Auffüllreaktion	52
D.2.2.7	Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	53
D.2.2.8	Phosphorylierung von Oligonukleotiden.....	53
D.2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
D.2.2.10	Plasmid-Isolierung.....	54
D.2.2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop™	54

D.2.2.12	DNA-Sequenzierung.....	54
D.2.2.13	RNA-Isolierung aus Zellen	55
D.2.2.14	cDNA-Synthese.....	55
D.2.2.15	quantitative RT-PCR.....	56
D.2.3	Proteinbiochemie.....	57
D.2.3.1	Isolierung cytosolischer Proteine.....	57
D.2.3.2	Isolierung membranständiger Proteine.....	57
D.2.3.3	Proteinnachweis mittels Western Blot.....	58
D.2.3.3.1	Reduzierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	58
D.2.3.3.2	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose.....	59
D.2.3.3.3	Detektion der Proteine.....	59
D.2.3.4	Gaussia Luciferase-Aktivitätsmessung.....	60
D.2.4	Zellbiologie	60
D.2.4.1	hMSC	60
D.2.4.1.1	Kryokonservierung von Zellen	60
D.2.4.1.2	Kultivierung von hMSC	60
D.2.4.1.3	Subkultivierung konfluenter hMSC.....	61
D.2.4.1.4	Klonale Expansion	61
D.2.4.1.5	Lipofektion von Plasmid-DNA oder siRNA.....	61
D.2.4.1.6	Stabile, ortsspezifische Integration mit der Φ C31-Integrase	62
D.2.4.1.7	Adipogene und osteogene Differenzierung	62
D.2.4.1.8	Oil Red O Färbung.....	64
D.2.4.1.9	Quantifizierung der Oil Red O Färbung.....	64
D.2.4.2	HEK-293.....	64
D.2.5	Statistik	65
E	Ergebnisse	66
E.1	Das TCF/LEF-Reportergen-System in hMSC.....	66
E.1.1	Vergleichende Analyse des konventionellen TOP/FOP-Flash-Reportergen-Systems mit dem TCF/LEF-Reportergen-System	66
E.1.2	Transiente Kotransfektion von hMSC mit Plasmiden und pN3-Bar-Gluc.....	67
E.1.3	Stabile Transfektion von hMSC mit pN3-Bar-Gluc.....	67

E.1.4	Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC	68
E.1.5	Einfluss der klonalen Expansion von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC.....	70
E.1.6	Einfluss der Passage von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC	71
E.2	Molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 im Wnt/β-Catenin-Signalweg.....	72
E.2.1	Basales mRNA- und Protein-Expressionslevel von LRP5 und LRP6.....	72
E.2.2	Knockdown-Effizienzen für LRP5, LRP6, β -Catenin und APC.....	73
E.2.3	Einfluss des Knockdowns von LRP5, LRP6, β -Catenin und APC auf die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion	74
E.2.4	Einfluss des Knockdowns von LRP5, LRP6, β -Catenin und APC auf das Wnt-Zielgen Axin2.....	75
E.2.5	Klonierung von LRP6.....	76
E.2.6	Überexpression von LRP5 und LRP6 auf mRNA-Ebene.....	78
E.2.7	Einführung von tag-Sequenzen in die Wnt-Korezeptoren.....	79
E.2.8	Überexpression von LRP5 und LRP6 auf Proteinebene.....	81
E.2.9	Einfluss der Überexpression der Wnt-Korezeptoren auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg	83
E.2.10	Einfluss der Überexpression der Wnt-Korezeptoren auf das Wnt-Zielgen Axin2.....	83
E.2.11	Rescue der LRP6-vermittelten Signaltransduktion.....	84
E.3	Analyse des Wnt/β-Catenin-Signalweges in stabil LRP-exprimierenden hMSC.....	86
E.3.1	Generierung stabil transfizierter hMSC mittels randomisierter Integration	86
E.3.1.1	Stabile Transfektion von hMSC mit Mock, LRP5 und LRP6.....	86
E.3.1.2	Expressionslevel der LRPs in stabil transfizierten hMSC auf mRNA-Ebene	86
E.3.1.3	Gaussia Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten LRP5-hMSC.....	87

E.3.2	Generierung stabil transfizierter hMSC mit dem Φ C31-Integrase-System zur ortsspezifischen Integration	87
E.3.2.1	Klonierung der verschiedenen pN3-attB-LRP-Plasmide	87
E.3.2.2	Kotransfektion der verschiedenen pN3-attB-Plasmide mit pCMVInt	88
E.3.2.3	LRP-Expressionslevel auf mRNA-Ebene	88
E.3.2.4	Einfluss der stabilen LRP-Expression auf die Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP	89
E.3.2.5	Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Expression	89
E.4	Differenzierung von TCF/LEF-Reportergen-hMSC	90
E.4.1	Adipogene Differenzierung	91
E.4.1.1	Einfluss der adipogenen Differenzierung auf die Gaussia Luciferase-Expression	91
E.4.1.2	Einfluss der adipogenen Differenzierung auf die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- γ	91
E.4.2	Osteogene Differenzierung.....	92
E.4.2.1	Einfluss der osteogenen Differenzierung auf die Gaussia Luciferase-Expression	92
E.4.2.2	Einfluss der osteogenen Differenzierung auf den osteogenen Marker Decorin	93
E.5	Rolle des Wnt-Korezeptors LRP6 in der Differenzierung von hMSC.....	94
E.5.1	Bildung fettähnlicher Vakuolen in hMSC nach RNAi gegen LRP6.....	94
E.5.2	Einfluss des LRP6-Knockdowns auf den Transkriptionsfaktor PPAR- γ	96
E.5.3	Repression der PPAR- γ Bildung mittels Rescue der LRP6-Expression	96
E.5.4	Verstärkte, chemisch induzierte adipogene Differenzierung nach RNAi gegen LRP6	97
F	Diskussion	99
F.1	Das TCF/LEF-Reportergen-System in hMSC.....	99
F.1.1	Vergleich des konventionellen TOP/FOP-Flash-Reportergen-Systems mit dem TCF/LEF-Reportergen-System	99

F.1.2	TCF/LEF-Reportergen-hMSC und Einflüsse auf ihre Aktivität	100
F.1.3	Adipogene und osteogene Differenzierung von TCF/LEF-Reportergen-hMSC.....	101
F.1.3.1	Adipogene Differenzierung	101
F.1.3.2	Osteogene Differenzierung.....	102
F.2	Molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 bei der Signaltransduktion im Wnt/β-Catenin-Signalweg	103
F.2.1	Endogene Expression der LRPs in hMSC	103
F.2.2	RNAi-basierte Analysen.....	103
F.2.2.1	Knockdown-Effizienz der LRPs	103
F.2.2.2	Veränderungen der Signaltransduktion nach RNAi gegen die LRPs.....	104
F.2.3	Überexpressionsstudien.....	107
F.2.4	Rescue der LRP6-Signaltransduktion	109
F.3	Wnt/β-Catenin-Signaltransduktion in LRP-hMSC	110
F.4	LRP6 und die Differenzierung von hMSC	112
G	Schlussfolgerungen und Ausblick	114
H	Literaturverzeichnis	116
I	Danksagung	133

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

αMEM	<i>Minimum Essential Medium alpha Modification</i>
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Amer1	<i>adenomatous polyposis coli membrane recruitment 1</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
attB	<i>attachment site in the bacterial genome</i>
attP	<i>attachment site in the phage genome</i>

B

β-Cat	β-Catenin
β-TrCP	<i>β-transducing repeat-containing protein</i>
Bar	<i>β-catenin activated reporter</i>
Bcl	<i>b-cell lymphoma</i>
bp	Basenpaare

C

C/EBPα	<i>CCAAT/enhancer binding protein α</i>
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42 protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CFU-f	<i>colony-forming unit fibroblast</i>
cJUN	<i>jun oncogene</i>
CK	<i>casein kinase</i>
CNA	Calcineurin
CNV	<i>copy number variant</i>
CRD	<i>Cystein-reiche Domäne/cysteine-rich domain</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
CtBP	<i>C-terminal-binding protein</i>

D

Daam1	<i>Dishevelled associated activator of morphogenesis 1</i>
D. melanogaster	<i>Drosophila melanogaster</i>
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
DEP	<i>Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin</i>
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIX	<i>Dishevelled and Axin</i>
Dkk	Dickkopf
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleotid
ds	<i>double stranded</i>

DTT	Dithiothreitol
Dvl	<i>Dishevelled</i>
DYT	<i>double yeast tryptone</i>
E	
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Evi	<i>Evenness interrupted</i>
F	
FBS	fetales bovines Serum
fuBar	<i>found unresponsive Bar</i>
Fzd	Frizzled
G	
GSK	<i>glycogen synthase kinase</i>
gDNA	genomische DNA
H	
HA	Hämagglutinin
HBM	<i>high-bone mass</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HMG	<i>high mobility group</i>
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSC	hämatopoetische Stammzellen
I	
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IP ₃	Inositoltriphosphat
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
J	
JUN	C-Jun N-terminale Kinase
K	
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L	
LDLR	<i>low-density lipoprotein receptor</i>
LEF	<i>lymphocyte enhancer factor</i>
Lgs	<i>legless</i>
LRP	<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
M	
mA	Milliampere
MACF1	<i>microtubule actin cross-linking factor 1</i>
MEC	<i>mammary epithelial cell</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>

mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MSC	mesenchymale Stammzellen
MW	<i>molecular weight</i>
N	
NES	<i>nuclear export signal</i>
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NLK	<i>nemo-like kinase</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nM	Nanomolar
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
O	
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OPPG	<i>osteoporosis pseudoglioma syndrome</i>
P	
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline + Tween® 20</i>
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	<i>postsynaptic density 95/disc large/zona occludens-1</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP5KI	Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase Typ I
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-γ
Pygo	Pygopus
Q	
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
R	
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RE	Restriktionsendonuklease
RGS	<i>regulator of G protein signaling</i>
RhoA	<i>Ras-homologous A</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rock	<i>Rho-associated kinase</i>
Ror	<i>RAR-related orphan receptor</i>
RS-Zellen	<i>rapidly self-renewing Zellen</i>
Ryk	<i>Related to receptor tyrosine kinase</i>
S	
S.O.B.	<i>Super Optimal Broth</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
ss	<i>single stranded</i>
T	
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>
TCF	<i>T-cell factor</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLE1	<i>transducin-like enhancer of split 1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	
U	<i>Unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	<i>untranslated region</i>
V	
V	Volt
Vol	Volumen
W	
Wnt	<i>wingless and Int-1</i>
WTX	<i>Wilms tumor gene on the X chromosome</i>

A ZUSAMMENFASSUNG

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) haben in den vergangenen Jahren aufgrund ihres potenziellen Einsatzes in der regenerativen Medizin sowie in der Prävention und Behandlung diverser Krankheiten ein großes wissenschaftliches Interesse geweckt. Einen wichtigen Aspekt stellt in diesem Zusammenhang die Regulation von Stammzellfunktionen durch Signalwege wie beispielsweise den Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg dar. Während am Signalweg beteiligte Komponenten und Teilfunktionen bereits beschrieben sind, existieren bezüglich der Initiation der Signaltransduktion an der Zelloberfläche auf Rezeptorebene lediglich rudimentäre Kenntnisse.

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von hMSC genauer untersucht.

Für die spezifische Quantifizierung β -Catenin-abhängiger Transkriptionsprozesse wurde zunächst ein TCF/LEF-Reporter-gen-System in hMSC etabliert. In diesem System erfolgt die Expression des Reporterproteins erst nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern und dessen Assoziation mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie. Im Vergleich mit dem konventionellen TOP/FOP-Flash-Reporter-gen-System zeigte das TCF/LEF-Reporter-gen-System eine deutlich höhere Sensitivität.

Mittels vergleichender Studien zur molekularen Funktion von LRP5 und LRP6, die neben der RNA-Interferenz (RNAi)-basierten Technologie auch Überexpressionsstudien und Rescue-Experimente beinhalteten, konnte eindeutig gezeigt werden, dass LRP6 eine entscheidende Rolle in der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion von hMSC übernimmt. Nach Applikation von Wnt-3a führte RNAi gegen LRP6 zu einer starken Abnahme der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion, wohingegen der Knockdown von LRP5 keine Veränderung zeigte. In einem umgekehrten Ansatz resultierte die Überexpression von LRP6 in einer starken Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Weges, während die Überexpression von LRP5 keinen nachhaltigen Einfluss zeigte. Darüber hinaus führte in LRP6-Knockdown-hMSC die Überexpression von LRP6 – jedoch nicht die von LRP5 – zur Rekonstitution der Wnt-3a-induzierten, β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion. Diese Daten weisen LRP6 als den Hauptrezeptor für die Wnt-3a/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion in hMSC aus, wobei diese Funktion nicht durch LRP5 ersetzt werden kann.

Da der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eng mit Differenzierungsprozessen assoziiert ist, wurde in diesem Kontext die Bedeutung der Wnt-Korezeptoren in hMSC evaluiert. Nach Knockdown von LRP6 war eine Differenzierung in die adipogene Richtung zu beobachten, die mit der Bildung fettähnlicher Vakuolen und einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ) assoziiert war. Unter dem Einsatz adipogener Zusätze konnte die Differenzierung von LRP6-Knockdown-hMSC in fettähnliche Zellen weiter verstärkt werden, was mit einer

deutlich gesteigerten Akkumulation von Fettvakuolen sowie einer weiteren Erhöhung der PPAR- γ Expression einherging. Interessanterweise resultierte die Überexpression von LRP6 in diesen fettähnlichen Zellen in einer Zunahme der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion mit einer gleichzeitigen Abnahme der Expression von PPAR- γ .

Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse, dass LRP6 nicht nur in der Wnt-3a-induzierten, β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion von hMSC eine tragende Rolle spielt, sondern auch für die Suppression der Differenzierung von hMSC in die adipogene Linie und damit für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters entscheidend ist. Somit stellt der Wnt-Korezeptor LRP6 ein vielversprechendes Ziel zur therapeutischen Manipulation von hMSC in zukünftigen klinischen Anwendungen, wie z.B. der regenerativen und präventiven Medizin, dar.

B EINLEITUNG

B.1 Stammzellen

Stammzellen zeichnen sich zum einen durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung aus, welche der Regulation bzw. zum Erhalt des Stammzell-Pools dient. Zum anderen können Stammzellen in verschiedene Zellentitäten differenzieren und dadurch zur Wundheilung und Geweberegeneration beitragen (Morrison et al., 1997; Nombela-Arrieta et al., 2011). Zellen, die diese Kriterien erfüllen, sind in nahezu allen Entwicklungsstadien und Gewebetypen vorhanden (Cai et al., 2004). Diese o.g. Stammzelldefinition erlaubt jedoch keine zuverlässige Unterscheidung von anderen sich teilenden Zellen, so dass eine lebenslange Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie ein essenzieller Beitrag zur Bildung bzw. Erneuerung von bestimmten Geweben als Kriterien gefordert wurden, die sich aber nicht durchsetzen (Cai et al., 2004).

Zur Erfüllung dieser Eigenschaften sind Stammzellen durch ihre Fähigkeit zur symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung charakterisiert (Abb. B-1).

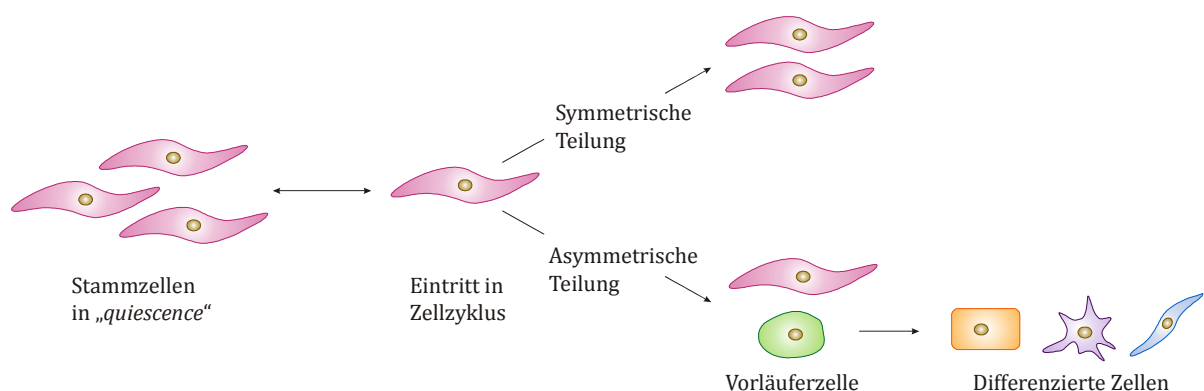


Abb. B-1: Unterschiedliche Zellteilungsmechanismen von Stammzellen.

Sobald Stammzellen aus der „quiescence“ in den Zellzyklus eintreten, können sie sich auf zwei unterschiedliche Arten teilen. Die symmetrische Teilung führt zur Entstehung von zwei identischen Tochterstammzellen, während durch die asymmetrische Teilung eine Stammzelle und eine Vorläuferzelle gebildet werden. Aus der Vorläuferzelle werden organspezifische, differenzierte Zellen gebildet. (modifiziert nach Cai et al., 2004)

Die symmetrische Zellteilung führt zu einer Vergrößerung des Stammzell-Pools durch die Bildung zweier identischer Tochterstammzellen (Cai et al., 2004; Morrison et al., 1997). Aus der asymmetrischen Teilung einer Stammzelle gehen eine identische Tochterstammzelle und eine Vorläuferzelle mit limitierter Replikationsfähigkeit hervor, die in die entsprechende Linie differenzieren kann, und somit zum Erhalt bzw. zur Regeneration von Gewebe beiträgt (Clevers, 2005; Morrison and Kimble, 2006). Ob Stammzellen im Rahmen des Zellzyklus in einen der beiden Zellteilungsmechanismen eintreten oder in einem Ruhezustand – auch „quiescence“ genannt – verbleiben, der entscheidend für eine lebenslange Erhaltung des jeweiligen Gewebes und des Stammzell-Pools ist, wird durch intrinsische sowie extrinsische Faktoren reguliert (Arai

and Suda, 2008; Cai et al., 2004). Zum einen befinden sich Stammzellen in direktem Kontakt mit ihrer Nische, wodurch das Potenzial zur Selbsterneuerung aufrechterhalten bleibt (Cai et al., 2004; Knoblich, 2008). Bei der Stammzellnische handelt es sich um eine spezifische Umgebung, die unter anderem durch eine bestimmte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, der Zell-Zell-Kontakte sowie von Cytokinen gekennzeichnet ist (Denham et al., 2005). Zum anderen existieren spezifische Genexpressionsprofile, die für die Steuerung der symmetrischen Zellteilung von Stammzellen verantwortlich sind und dazu dienen festzulegen, wann Stammzellen in den Differenzierungsprozess eintreten (Cai et al., 2004; Knoblich, 2008). Dazu werden Faktoren, die für die Bestimmung des Zelltyps verantwortlich sind, asymmetrisch in der Zelle verteilt und während der Mitose unterschiedlich zwischen den beiden Tochterzellen aufgeteilt (Clevers, 2005; Morrison and Kimble, 2006).

Aufgrund ihrer Entwicklungsgeschichte lassen sich Stammzellen in zwei grundsätzlich verschiedene Typen einteilen. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) zählen zu den ontogenetisch frühesten Stammzellen und kommen ausschließlich im Blastozystenstadium vor (Weissman, 2000). Davon unterscheidet man die postembryonalen Stammzellen, die nach dem Abschluss der Embryonalentwicklung im Organismus vorhanden sind, nämlich fetale, neonatale und adulte Stammzellen (Korbling and Estrov, 2003).

Ein weiteres wichtiges Merkmal, das der Unterscheidung von Stammzellen zugrunde liegt, ist ihr Differenzierungspotenzial. So gelten ES-Zellen als pluripotent, wohingegen adulte Stammzellen einen multipotenten Charakter aufweisen (Denham et al., 2005).

B.1.1 Embryonale Stammzellen

Erstmalig konnten ES-Zellen 1981 unabhängig von zwei Forschergruppen aus der inneren Zellmasse einer murinen Blastozyste isoliert und *in vitro* kultiviert werden (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Dagegen gelang es erst im Jahr 1998 ES-Zellen aus humanen Blastozysten zu gewinnen und in Kultur zu vermehren (Thomson et al., 1998). Dieser wissenschaftliche Fortschritt eröffnete den Weg zur Generierung von ES-Zelllinien, die von grundlegender Bedeutung für die medizinische Forschung sind. Im Unterschied zu anderen Stammzellen besitzen ES-Zellen die Eigenschaft, in Langzeitkulturen unlimitiert zu proliferieren, wobei ihr pluripotenter Charakter aufrechterhalten bleibt. Dies ist unter anderem auf das hohe Expressionslevel der Telomerase zurückzuführen (Choumerianou et al., 2008). Die Fähigkeit der Pluripotenz befähigt ES-Zellen dazu, sich in Zellen aller drei Keimblätter – Ektoderm, Mesoderm und Entoderm – zu differenzieren (Choumerianou et al., 2008). Sie sind somit in der Lage, in mehr als 220 verschiedene Zelltypen auszdifferenzieren, die im erwachsenen Organismus vorkommen. Allerdings tragen ES-Zellen jedoch nicht zur Bildung extraembryonaler Gewebe wie z.B. der Plazenta bei. Diese zusätzliche Eigenschaft ist der befruchteten Eizelle vorbehalten, da sie in alle Zelltypen differenzieren und somit einen neuen Organismus generieren kann, was als Totipotenz bezeichnet wird (Denham et al., 2005).

B.1.2 Adulte Stammzellen

Bei adulten Stammzellen handelt es sich um gewebe- oder organständige Zellen des postnatalen Organismus mit einer limitierten Selbsterneuerungsrate und einer eingeschränkten Differenzierungskapazität (Choumerianou et al., 2008; Korbaling and Estrov, 2003). Sie zeichnen sich vor allem durch ihr Vermögen aus, in die verschiedenen Zelltypen des entsprechenden Gewebes bzw. Organs zu differenzieren, was als Multipotenz bezeichnet wird (Korbaling et al., 2003). Somit kommt ihnen eine wichtige Funktion bei der Regeneration des Blutes oder der Haut bzw. beim Ersatz differenzierter Zellen nach einer Verletzung des entsprechenden Gewebes zu (Martin-Rendon and Watt, 2003). Gewebe- bzw. organständige adulte Stammzellen sind unter anderem für Knochenmark, Leber, Darm, Skelettmuskel, Haut und Blut beschrieben worden (Graf and Stadtfeld, 2008; Scholer, 2004), wobei hämatopoetische Stammzellen (HSC) die am besten charakterisierten adulten Stammzellen darstellen.

In den letzten Jahren wurde mehrfach beschrieben, dass gewebeständige Stammzellen des erwachsenen Organismus auch keimblattübergreifend differenzieren können. Diese Fähigkeit wird als Plastizität oder Transdifferenzierung bezeichnet. Mesodermale Stammzellen aus dem Knochenmark konnten beispielsweise in Zelltypen des Gehirns wie Neuronen und Gliazellen differenzieren (Mezey et al., 2000). Des Weiteren führte die Transplantation einer einzelnen hämatopoetischen Stammzelle über die Regeneration des blutbildenden Gewebes hinaus auch zur Bildung von epithelialen Zellen wie Lunge, Gastrointestinaltrakt und Haut (Krause et al., 2001). Außerdem konnte gezeigt werden, dass neuronale Stammzellen aus dem Gehirn erwachsener Mäuse in Zellen aller drei Keimblätter ausdifferenzieren (Clarke et al., 2000).

Die Beschreibung der Plastizität adulter Stammzellen, die jedoch höchst umstritten ist, stellt das klassische Modell der Stammzelldifferenzierung, etabliert durch Untersuchungen des hämatopoetischen Systems, in Frage. In diesem hierarchischen Modell bildet eine multipotente Stammzelle den Ursprung für die Generierung terminal differenzierter Zellen über verschiedene Stufen von Vorläuferzellen, wobei sich das Differenzierungspotenzial und die Proliferationsfähigkeit gegenläufig verhalten (Korbaling and Estrov, 2003).

B.1.3 Mesenchymale Stammzellen

Zu den adulten, im Knochenmark residierenden Stammzellen werden neben den HSC auch die mesenchymalen Stammzellen (MSC) gezählt (Herzog et al., 2003). Die Erstbeschreibung der MSC erfolgte 1966 und geht zurück auf Alexander Friedenstein, der die Bildung von nicht-hämatopoetischem Gewebe nach Transplantation von Knochenmarkstroma beobachtete (Friedenstein et al., 1966). 4 Jahre später konnte gezeigt werden, dass sich nach der Aussaat von Knochenmarkzellen Kolonien bildeten, die plastikadhärente, fibroblastenähnliche Zellen aufwiesen (Friedenstein et al., 1970). Daraus ging auch der Begriff CFU-f (*colony-forming unit-fibroblast*) hervor, der die Ursprungszelle einer solchen Kolonie bezeichnete. Bis heute existiert jedoch kein

singulärer, spezifischer Marker, der eine Identifizierung von MSC *in vitro* erlaubt (Keating, 2012). Somit dient bei der Isolierung dieser Stammzellpopulation aus Biopsien des Knochenmarks der sogenannte CFU-f-Assay dem Nachweis adhärenter, spindelförmiger Zellen mit klonalem Wachstum und führt damit zur Selektion und Anreicherung von MSC aufgrund ihrer Adhärenz an Plastik, wozu HSC und andere Zellen des Knochenmarks nicht fähig sind (Pittenger et al., 1999).

Die Nomenklatur für diese multipotenten Zellen aus dem Knochenmark ist seit jeher heterogen. So finden sich in der Literatur die verschiedensten Bezeichnungen wie z.B. markstromale Stammzellen, mesenchymale Stammzellen oder mesenchymale Vorläuferzellen wieder (Charbord, 2010). 2005 befasste sich die „*International Society for Cellular Therapy*“ mit der Nomenklatur und schlug eine alternative Definition der MSC als multipotente mesenchymale stromale Zellen mit dem gleichen Akronym vor (Horwitz et al., 2005). Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit steht die Abkürzung MSC für mesenchymale Stammzellen.

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit sowie dem hohen Stammzellanteil werden MSC hauptsächlich aus dem Knochenmark gewonnen (Kemp et al., 2005). Aber auch aus anderen Geweben wie Fett, Leber, Muskel, Zahnmark von Milchzähnen, Amnionflüssigkeit, Fetal- und Nabelschnurblut können MSC isoliert und *in vitro* kultiviert werden (da Silva Meirelles et al., 2006; Miura et al., 2003; Pittenger and Marshak, 2001). MSC zeichnen sich vor allem durch ihr Potenzial zur Differenzierung in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten aus, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte (Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Darüber hinaus können MSC auch in andere mesenchymale Gewebe wie Muskeln, Sehnen, Bänder oder Fibroblasten ausdifferenzieren (Alfaro et al., 2011; Baksh et al., 2004). Zudem sind MSC in der Lage Knochenmarkstroma zu bilden, wodurch sie nachhaltig die Hämatopoese unterstützen (Uccelli et al., 2008).

Bei der *in vitro*-Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) können im Laufe der Passagen unterschiedliche Subpopulationen beobachtet werden. In frühen Passagen liegt eine heterogene Stammzellpopulation vor. Diese setzt sich zusammen aus kleinen, spindelförmigen Zellen, die sich schnell teilen, und großen, flachen Zellen, die eine langsame Teilungsrate aufweisen, wobei die kleinen Zellen deutlich überwiegen (Mets and Verdonk, 1981). Während der weiteren Subkultivierung steigt der Anteil der großen Zellen, bis die sich der Seneszenz nähernde Kultur hauptsächlich aus diesen Zellen besteht und somit eine relativ homogene Population darstellt (Colter et al., 2000). Später wurde zu den beiden bisher bekannten Subpopulationen in hMSC-Kulturen eine dritte Population beschrieben. Dabei handelt es sich um äußerst kleine, runde Zellen, die sich sehr schnell teilen, weshalb sie auch als RS-Zellen (*rapidly self-renewing*) bezeichnet werden (Colter et al., 2000; Colter et al., 2001). Sie unterscheiden sich von den reiferen Zellen in der Kultur hinsichtlich bestimmter Oberflächenmarker und partiell auch in der Proteinexpression. Es wird zudem davon ausgegangen, dass die RS-Zellen die Anfangs-

population einer Kultur darstellen und ein großes Potenzial zur Differenzierung in verschiedene Abstammungslinien aufweisen (Colter et al., 2001).

B.1.4 Induzierte pluripotente Stammzellen

Als induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) werden pluripotente Stammzellen bezeichnet, die aus der künstlichen Reprogrammierung von nicht-pluripotenten, somatischen Zellen hervorgehen. Der Arbeitsgruppe um Shinya Yamanaka gelang es 2006 erstmals iPSC aus murinen embryonalen und adulten Fibroblasten zu generieren, wozu diese retroviral mit den vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 transduziert wurden (Takahashi and Yamanaka, 2006). Bezüglich diverser Eigenschaften, wie z.B. Wachstumsverhalten, Genexpressionsmuster, Differenzierungsfähigkeit und Teratombildung, ähneln iPSC den natürlich vorkommenden pluripotenten ES-Zellen (Takahashi and Yamanaka, 2006). Kurze Zeit später wurde die Erzeugung humaner iPSC aus Fibroblasten, ebenfalls mittels retroviraler Transduktion, unabhängig von drei Forschergruppen beschrieben (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Interessanterweise war dabei eine Reprogrammierung ohne das Proto-Onkogen c-Myc möglich, indem eine andere Genkombination – Oct4, Sox2, Nanog und Lin28 – verwendet wurde (Yu et al., 2007). Ohne Verwendung von c-Myc zeigten die iPSC zwar eine deutlich verringerte Tumorigenität, jedoch nahm die bereits geringe Ausbeute an pluripotenten Zellen von 0,01-0,1% (Takahashi and Yamanaka, 2006) noch weiter ab (Nakagawa et al., 2008).

Neben dem Proto-Onkogen c-Myc stellt auch die retrovirale Transduktion der Transkriptionsfaktoren aufgrund von Veränderungen des Genoms der transduzierten Zellen ein großes Problem dar. Alternative Dedifferenzierungsmethoden wie die Verwendung von nicht-integrierenden Adenoviren (Stadtfield et al., 2008), Plasmiden (Okita et al., 2008), *small molecule compounds* (Shi et al., 2008) oder rekombinanten, zellpenetrierenden Proteinen (Zhou et al., 2009) wurden auch erfolgreich zur Erzeugung von iPSC eingesetzt, wobei allerdings auch hier eine deutlich geringere Reprogrammierungseffizienz zu verzeichnen war. Eine weitere und durchaus effiziente Methode stellt die Applikation *in vitro*-transkribierter RNA dar, die so modifiziert wird, dass sie keine angeborene Immunantwort auslösen kann (Warren et al., 2010). Des Weiteren konnte durch die Expression eines speziellen microRNA-Clusters die Reprogrammierung humaner und muriner somatischer Zellen zu iPSC gezeigt werden, welche ähnliche Eigenschaften aufwiesen wie die unter Verwendung von Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 generierten iPSC (Anokye-Danso et al., 2011). Die geringe Effizienz der verschiedenen Dedifferenzierungsmethoden, das Problem von Insertionen in das Genom bei viraler Transduktion, die begünstigte Tumorentwicklung aufgrund des Einsatzes von Onkogenen und die teilweise unvollständige Reprogrammierung der Zellen stellen jedoch zur Zeit noch bedeutende Hindernisse im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz von iPSC dar (Hanna et al., 2007).

B.1.5 Stammzellen und therapeutische Ansätze

Therapeutisch sollen Stammzellen zukünftig Anwendung bei Patienten mit z.B. hereditären Krankheiten, Parkinson, Alzheimer, Multipler Sklerose, Verletzungen der Wirbelsäule, Diabetes mellitus oder Krebs finden (Ciavarella et al., 2011; Horwitz et al., 2001; Larijani et al., 2012; Lunn et al., 2011; Venkataramana et al., 2010). Hierfür sind eine hohe Zellteilungsrate und ein hohes Differenzierungspotenzial der Zellen von vorrangiger Relevanz. Pluripotente ES-Zellen weisen genau diese Eigenschaften auf, jedoch stellt ihre Gewinnung aus potenziell lebensfähigen Embryonen vor allem ein ethisches Problem dar. Zudem bergen ES-Zellen neben dem Risiko einer Abstoßung durch das Immunsystem des Patienten (Denham et al., 2005) besonders die Gefahr der Teratom-Bildung (Thomson et al., 1998).

Dennoch erteilte die FDA der amerikanischen Fa. Geron 2009 die Erlaubnis für die erste klinische Studie mit humanen ES-Zellen zur Behandlung querschnittsgelähmter Menschen. Grundlage dafür stellte die Verbesserung der Bewegungsfähigkeit gelähmter Ratten nach Applikation von aus ES-Zellen generierten Oligodendrozyten dar (Keirstead et al., 2005). 2010 wurde die Studie mit 4 Patienten begonnen, die die injizierten Zellen offenbar gut vertrugen und keine Nebenwirkungen zeigten. Rund 1 Jahr später wurde die Studie jedoch aus finanziellen Gründen eingestellt, eine Aussage zum Heilungserfolg wurde nicht getroffen (ir.geron.com).

In einer weiteren Studie durch die Fa. Advanced Cell Technology wurden ein Patient mit Morbus Stargardt (vererbte, juvenile Makuladegeneration) und ein Patient mit altersbedingter Makuladegeneration mit retinalen, pigmentierten Epithelzellen behandelt, die aus ES-Zellen hergestellt wurden. Die transplantierten Zellen haben sich in die Retina eingegliedert und es konnten weder Abstoßungsreaktionen noch eine Tumorbildung festgestellt werden, jedoch handelt es sich hierbei lediglich um erste Vorergebnisse (Schwartz et al., 2012).

Ein weiteres Anwendungsgebiet stellt Diabetes mellitus dar, der durch den Ersatz zerstörter β -Zellen behandelt werden könnte. B-Zell-ähnliche Vorläuferzellen, die Insulin sekretieren, konnten unter anderem aus adulten Stammzellen des Pankreas und des Knochenmarks generiert werden (Mimeault and Batra, 2006). Die Implantation dieser β -Zell-ähnlichen Vorläuferzellen in diabetische Mäuse führte zu einer Reversion der Symptome (Ramiya et al., 2000). Die Fa. ViaCyte hält seit 2009 ein Patent zur Herstellung von pankreatischen, Insulin-sekretierenden Zellen aus humanen ES-Zellen (Kroon et al., 2008). Ein Antrag auf klinische Studien wurde aber bislang noch nicht gestellt.

Eine 2011 veröffentlichte Studie bezüglich CNVs (*copy number variants*) in pluripotenten humanen ES-Zellen und iPSC im Vergleich zu somatischen Stammzellen zeigte, dass pluripotente Stammzellen deutlich häufiger Genom-Aberrationen wie Duplikationen und Deletionen aufweisen (Laurent et al., 2011). Aufgrund dessen befürchtet man eine Begünstigung der Tumorentstehung und fordert eine fortlaufende Prüfung der Genomstabilität im Hinblick auf die klinische Sicherheit für die Patienten.

Auch wenn die voranstehend beschriebenen Studien mit ES-Zellen durchaus erste Erfolge darstellen, gelten gerade im Hinblick auf die umstrittene Gewinnung der ES-Zellen vor allem adulte Stammzellen als großer Hoffnungsträger für die regenerative Medizin. Dies spiegelt sich auch in der großen Zahl klinischer Studien mit adulten Stammzellen wieder (Trounson et al., 2011)(clinicaltrials.gov). Ein großer Vorteil der Verwendung adulter Stammzellen liegt in der Gewinnung patienteneigener Stammzellen und der damit verbundenen Immuntoleranz nach autologer Transplantation. Jedoch sind adulte Stammzellen nicht aus jedem Gewebe so leicht zu isolieren, wie beispielsweise aus Knochenmark oder Blut. Bis heute stellen daher HSC die am häufigsten eingesetzte Stammzellpopulation in der klinischen Anwendung dar. Seit der ersten allogenen Knochenmarktransplantation bei einem Leukämiepatienten durch Edward Donnall Thomas im Jahr 1970 (Buckner et al., 1970), wofür er 1990 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet wurde, wird dieses Verfahren routinemäßig zur Behandlung von Leukämien und Lymphomen eingesetzt.

Die Heilung eines an Fanconi-Anämie leidenden Jungen ist ein weiteres positives Beispiel für den therapeutischen Einsatz von Stammzellen. Der Junge erhielt dazu Stammzellen aus dem Nabelschnurblut seiner gesunden Schwester, wodurch sein blutbildendes System regeneriert werden konnte (Gluckman et al., 1989).

Vor 4 Jahren erfolgte die erste Transplantation eines menschlichen Organs – einer Luftröhre – welches unter Einsatz adulter Stammzellen generiert wurde (Macchiarini et al., 2008). Dafür wurde eine humane Spender-Luftröhre von den Zellen und MHC-Antigenen befreit und mit Epithelzellen sowie Chondrozyten, die aus hMSC des Empfängers generiert wurden, besiedelt. Nach Implantation wurde damit der linke Stammbronchus des Patienten ersetzt. Das Transplantat wies normale mechanische Eigenschaften auf und es wurde auch keine Abstoßungsreaktion beobachtet. Dieses Beispiel weist auf das immense Potenzial von Stammzellen hin, welches im Bereich des *Tissue Engineering* genutzt werden kann (Baiguera et al., 2012).

Dass aber auch nicht-embryonale Stammzellen mit Vorsicht bei der klinischen Verwendung eingesetzt werden sollten, verdeutlicht der Fall eines Jungen mit Louis-Bar-Syndrom. Zur Behandlung dieser Krankheit wurden ihm humane fetale neuronale Stammzellen ins Gehirn injiziert. 4 Jahre nach der ersten Injektion wurde ein multifokaler Gehirn-Tumor diagnostiziert, der durch die Spender-Zellen, die vermutlich Vorläuferzellen enthielten, ausgelöst wurde (Amariglio et al., 2009).

Eine Möglichkeit Stammzellen für therapeutische Zwecke zu modifizieren bzw. aus ihrer Nische zu mobilisieren, wäre deren Manipulation über den Eingriff in entsprechende Signaltransduktionskaskaden. Neben dem TGF- β (*transforming growth factor*)-Signalweg (Watabe and Miyazono, 2009) und der Notch-Signalkaskade (Perdigoto and Bardin, 2012) spielt auch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine große Bedeutung bei der Regulation von Stammzeleigenschaften (Nusse, 2008). Daher ist ein genaues Verständnis der Signaltransduktionsmechanismen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von

essenzieller Bedeutung, um gezielt therapeutische Manipulationen von Stammzellen durchführen zu können.

B.2 Wnt-Signalweg

Beim Wnt-Signalweg handelt es sich um eine hochkonservierte Signaltransduktionskaskade, die eng mit der Evolution von mehrzelligen Organismen assoziiert ist. So existiert dieser Signalweg bei einfachen Mehrzellern wie z.B. der Seeanemone bis hin zu komplexen Lebewesen wie z.B. Säugetieren. Man geht davon aus, dass die Diversität der Wnt-Liganden auf eine frühe Entwicklung in der Evolution der Metazoa vor rund 650 Millionen zurückzuführen ist (Kusserow et al., 2005). In diesem Zusammenhang wird dem Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Organentwicklung, in der Embryogenese, der Krebsentstehung sowie der Zell-Determination zugeschrieben (Komiya and Habas, 2008).

Die Bezeichnung Wnt setzt sich aus Wg für *wingless* und Int-1 für *integration-1* zusammen. Bei *wingless* handelt es sich um ein Gen von *Drosophila melanogaster* (Rijsewijk et al., 1987), in dem Mutationen zu einer flügellosen Variante führen (Klaus and Birchmeier, 2008). Int-1 stellt das orthologe Gen der Maus, heute als Wnt-1 bezeichnet, dar, welches als Proto-Onkogen die Entstehung von Brustkrebs in Mäusen auslöst, wenn es durch Integration des Maus-Mammatumovirus (MMTV) aktiviert wird (Nusse and Varmus, 1982).

Der Wnt-Signalweg lässt sich in Bezug auf die Abhängigkeit von β -Catenin bei der Signaltransduktion in drei grundlegende Wege unterteilen (Abb. B-2). Zum einen existiert der kanonische, β -Catenin-abhängige Signalweg (Abb. B-2 links), der den am besten untersuchten Wnt-Weg darstellt. Auf der anderen Seite finden sich nicht-kanonische, β -Catenin-unabhängige Signalkaskaden, zu denen unter anderem der PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg (Abb. B-2 Mitte) und der Wnt/Calcium-Signalweg (Abb. B-2 rechts) gehören. Welcher der Wege durch die Wnt-Liganden angesteuert wird, hängt neben den spezifischen Wnts auch von den vorhandenen Oberflächenrezeptoren ab (van Amerongen et al., 2008).

An der Weiterleitung des Signals in den drei genannten Signalwegen ist das cytoplasmatische Phosphoprotein Dvl (*Dishevelled*) beteiligt. Säugetiere besitzen drei Dvl-Proteine, Dvl-1, Dvl-2 und Dvl-3, die drei hochkonservierte Domänen aufweisen: die N-terminale DIX (*Dishevelled and Axin*)-Domäne, die zentrale PDZ (*postsynaptic density 95/disc large/zona occludens-1*)-Domäne und die C-terminale DEP (*Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin*)-Domäne (Gao and Chen, 2010). Nach Wnt-Bindung interagiert Dvl über seine verschiedenen Domänen je nach Signalweg mit unterschiedlichen Proteinen, wodurch das Signal weitergegeben wird (Habas and Dawid, 2005).

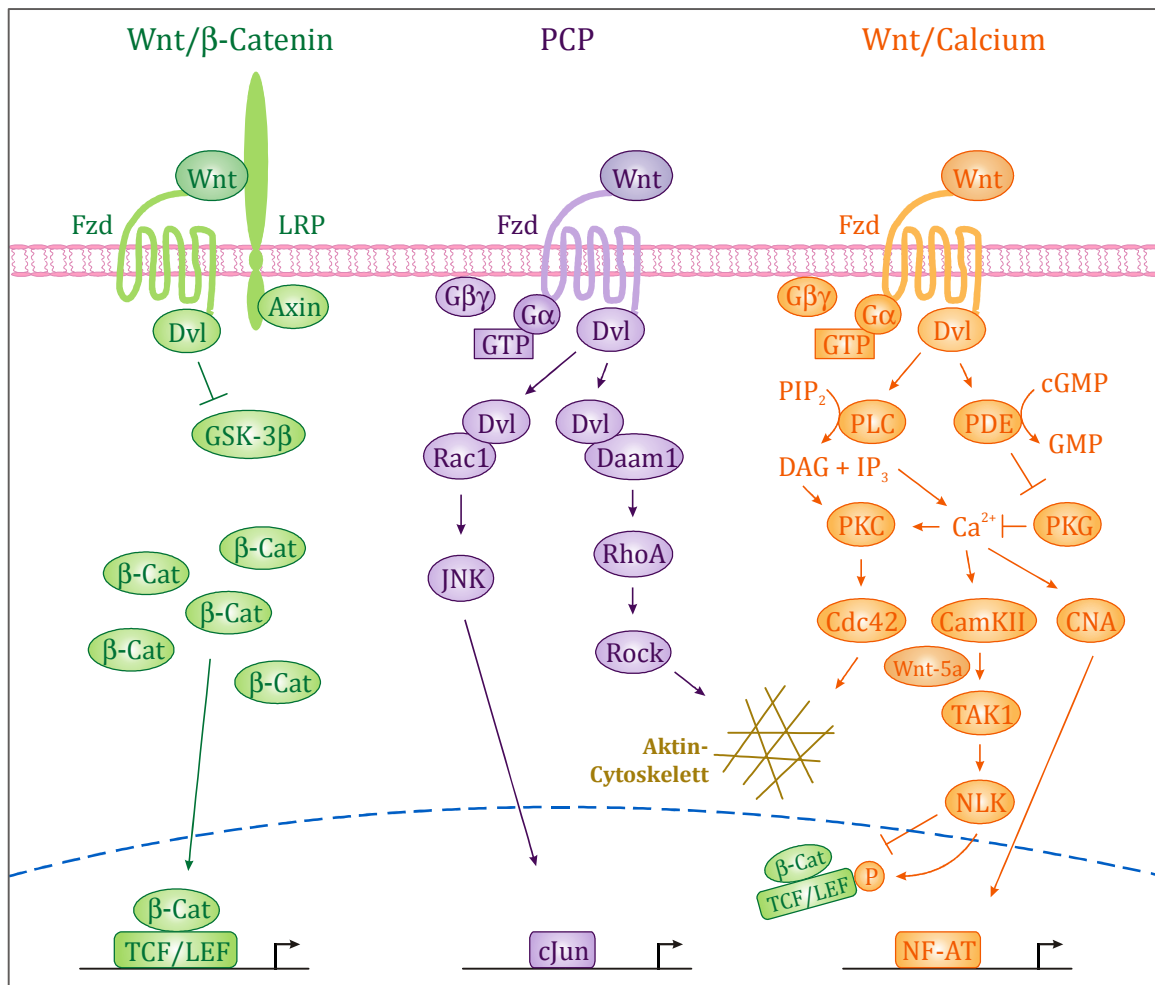


Abb. B-2: Überblick über die Wnt-abhängigen Signalwege Wnt/β-Catenin, PCP und Wnt/Calcium.

Der Wnt-Signalweg lässt sich in den kanonischen, β-Catenin-abhängigen Weg (links) und die nicht-kanonischen, β-Catenin-unabhängigen Signalwege PCP (*planar cell polarity*; Mitte) und Wnt/Calcium (rechts) unterteilen. (modifiziert in Anlehnung an Semenov et al., 2007)

Detaillierte Erklärungen sind in den entsprechenden Kapiteln gegeben (Wnt/β-Catenin B.2.2; PCP B.2.1.1; Wnt/Calcium B.2.1.2).

B.2.1 Nicht-kanonische Wnt-Signalwege

Es existieren verschiedene nicht-kanonische Wnt-Signalwege, wobei jedoch eine genaue Abgrenzung der einzelnen Wege aufgrund von Überschneidungen nicht eindeutig möglich ist (Semenov et al., 2007). Zu den am besten charakterisierten nicht-kanonischen Signalwegen zählen der PCP-Signalweg und der Wnt/Calcium-Signalweg. Beide Signalwege führen nicht zu einer Akkumulation von β-Catenin, was den wichtigsten Unterschied zum kanonischen Wnt-Signalweg darstellt.

B.2.1.1 PCP-Signalweg

Der PCP-Signalweg wurde zuerst in *Drosophila* entdeckt, wo er für die Kontrolle der Zellpolarität verantwortlich ist (Adler, 1992) und somit eine wichtige Rolle in der Gastrulation und Neurulation während der Embryogenese spielt (Seifert and Mlodzik, 2007). An der Signaltransduktion sind primär Mitglieder der Frizzled (Fzd)-Rezeptor-

familie und Dvl beteiligt, wohingegen weder die LRPs (*low-density lipoprotein receptor-related proteins*) noch TCF (*T-cell factor*) involviert sind. Während man bei *Drosophila* zudem davon ausgeht, dass auch keine Wnt-Proteine am PCP-Signalweg beteiligt sind, scheinen in höheren Vertebraten Wnt-Liganden durchaus von Bedeutung zu sein (van Amerongen et al., 2008). Nach Wnt-Bindung an Fzd erfolgt die Aktivierung von G-Proteinen und Dvl. Dvl überträgt das Signal über zwei getrennte Wege weiter. Zum einen vermittelt es die Aktivierung der C-Jun N-terminalen Kinase (JNK) über Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), wodurch es zur Transkription cJUN (*jun oncogene*)-abhängiger Gene kommt (Semenov et al., 2007). Auf der anderen Seite bildet Dvl einen Komplex mit Daam1 (*dishevelled associated activator of morphogenesis 1*) aus, wodurch über das G-Protein RhoA (*Ras-homologous A*) die Aktivierung von Rock (*Rho-associated kinase*) und die damit verbundenen Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts vermittelt werden (Komiya and Habas, 2008).

B.2.1.2 Wnt/Calcium-Signalweg

Beim Wnt/Calcium-Signalweg, der anhand von Experimenten mit *Xenopus* beschrieben wurde (Kuhl et al., 2000), führt die Interaktion von Wnt mit Fzd zur Aktivierung von G-Proteinen, die die Phospholipase C (PLC) und die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG), was eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels zur Folge hat. Außerdem wird über den Wnt/Fzd-Komplex die cGMP (cyclisches Guanosin-Monophosphat)-abhängige Phosphodiesterase (PDE) aktiviert, so dass unter Verbrauch von cGMP die Proteinkinase G (PKG) inhibiert und somit ebenfalls die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht wird. Sowohl Calcium als auch DAG können nun die PKC aktivieren, die über Cdc42 (*cell division cycle 42 protein*) Einfluss auf das Aktin-Cytoskelett nimmt (Komiya and Habas, 2008). Des Weiteren wird durch Calcium über die Phosphatase Calcineurin (CNA) der Transkriptionsfaktor NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) aktiviert, der für die Regulation der Gastrulation und der Zelladhäsion entscheidend ist (Semenov et al., 2007). Durch den Calcium-Anstieg wird außerdem die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase 2 (CaMKII) moduliert, die unter Wnt-5a-Stimulation über TAK1 (*TGF-β activated kinase 1*) und NLK (*nemo-like kinase*) zur Phosphorylierung von TCF führt, wodurch die Interaktion des TCF/β-Catenin-Komplexes mit der DNA verhindert und somit der kanonische Wnt-Weg inhibiert wird (Ishitani et al., 2003; Torres et al., 1996).

B.2.2 Wnt/β-Catenin Signalweg

Im kanonischen und damit β-Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg unterliegt β-Catenin in Abwesenheit eines Wnt-Liganden dem Abbau durch das Proteasom im Cytoplasma (Abb. B-3 links). Dazu bildet sich ein Degradationskomplex, der aus dem Tumorsuppressor APC (*adenomatous polyposis coli*), dem Gerüstprotein Axin und den beiden Kinasen CK1α (*casein kinase 1α*) und GSK-3β (*glycogen synthase kinase-3β*) besteht (Kimelman and Xu, 2006). Die Kinasen führen zu einer sequenziellen Phosphorylierung des N-Terminus von

β -Catenin (MacDonald et al., 2009), das nachfolgend durch das F-Box-Protein β -TrCP (*β -transducing repeat-containing protein*) ubiquitiniert und durch das 26S Proteasom abgebaut wird (Nelson and Nusse, 2004). Unter diesen Bedingungen wird das β -Catenin-Level in der Zelle gering gehalten. Außerdem findet keine Transkription von Wnt-Zielgenen statt, da diese durch Bindung der transkriptionellen Repressoren Groucho und CtBP an TCF/LEF (*T-cell factor/lymphocyte enhancer factor*) verhindert wird (Angers and Moon, 2009).

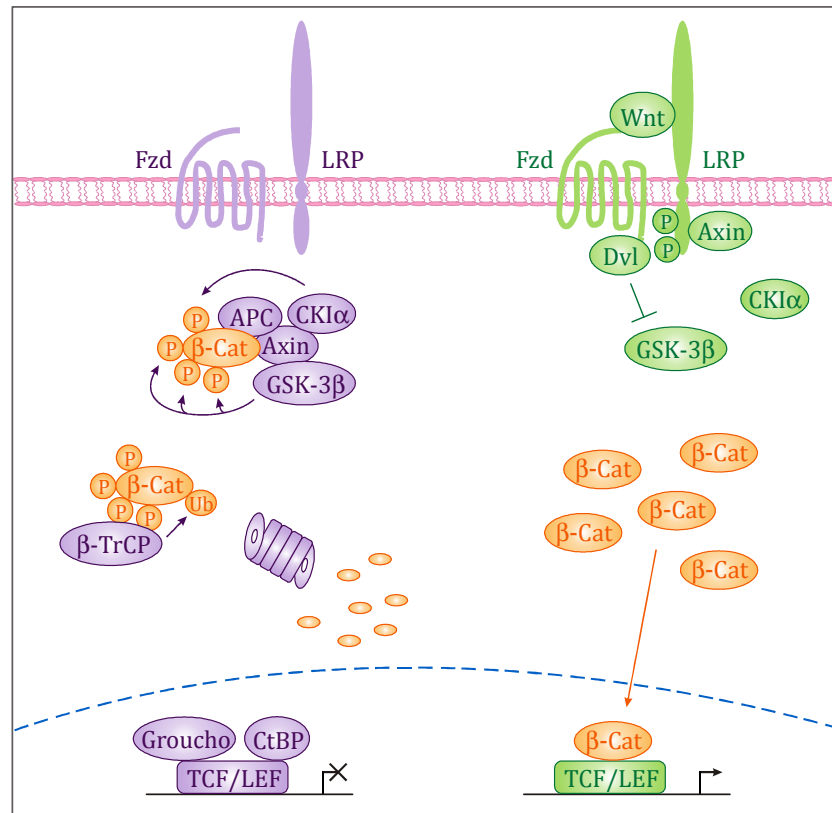


Abb. B-3: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.

In Abwesenheit eines Wnt-Liganden (links) wird β -Catenin (β -Cat) im Degradationskomplex phosphoryliert und im Anschluss an die Ubiquitinierung mittels β -TrCP durch das Proteasom abgebaut. Die Transkription von Zielgenen wird durch die Repressoren Groucho und CtBP unterbunden.

Nach Wnt-Stimulation (rechts) bilden Wnt, Fzd und LRP einen ternären Komplex, wobei der Degradationskomplex zerfällt. β -Catenin transloziert in den Nukleus, wo es durch Interaktion mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen induziert.

Zur Initiierung der Signalkaskade (Abb. B-3 rechts) bildet sich an der Zelloberfläche ein ternärer Komplex, der sich aus den Rezeptoren Fzd, den Wnt-Korezeptoren LRP5 oder LRP6 sowie einem Wnt-Liganden zusammensetzt. Als Folge kommt es zum Zerfall des Degradationskomplexes, so dass keine Phosphorylierung von β -Catenin stattfinden kann (Gordon and Nusse, 2006). Das Resultat ist eine Akkumulation von hypophosphoryliertem β -Catenin im Cytosol, das in den Zellkern transloziert und dort die Transkription von Wnt-Zielgenen durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie vermittelt (Jamieson et al., 2012). Alternativ kann die Signaltransduktion auch durch

LiCl initiiert werden, welches die GSK-3 β und somit die Phosphorylierung von β -Catenin hemmt (Hedgepeth et al., 1997; Stambolic et al., 1996).

B.3 Signalprozesse im Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Die Signalweiterleitung im Wnt/ β -Catenin-Signalweg nach Bindung eines Liganden ist gekennzeichnet durch die Interaktion, Modifikation und Regulation von Rezeptoren sowie von cytoplasmatischen und nukleären Proteinen.

B.3.1 Liganden des Wnt/ β -Catenin-Signalweges

Zu den am besten charakterisierten Liganden des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zählen die Mitglieder der Wnt-Familie sowie der Dkk-Familie.

B.3.1.1 Wnt-Familie

Die Familie der Wnt-Liganden umfasst im humanen System 19 Mitglieder, wobei sie vielmehr anhand ihrer Sequenz als aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften definiert sind (Logan and Nusse, 2004). Wnt-Proteine sind Morphogene, was bedeutet, dass sie in Abhängigkeit von der Konzentration wirken (Cadigan and Nusse, 1997). Darüber hinaus zählen Wnts zur Familie Cystein-reicher sezernierter Liganden, die sich durch eine N-terminale Signalsequenz, mehrere potenzielle N-Glykosylierungsstellen und eine hochkonservierte Anordnung von 23 Cysteinen auszeichnen (Miller, 2002). Nach Translokation der Wnts in das Endoplasmatische Retikulum erfolgen posttranslationale Modifikationen wie die initiale Glykosylierung und Palmitoylierung, woran sich weitere Glykosylierungen im Golgi-Apparat und letztendlich die Sekretion aktiver Wnt-Liganden anschließen (Kikuchi et al., 2007). Für die Sekretion der Wnts werden Evi (*Evenness interrupted*) und der Multiprotein-Komplex Retromer benötigt, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht vollständig geklärt ist (Bartscherer and Boutros, 2008; Takada et al., 2006). Untersuchungen bezüglich der posttranslationalen Modifikationen an Wnt-3a (Komekado et al., 2007; Willert et al., 2003) und Wnt-5a (Kurayoshi et al., 2007) weisen darauf hin, dass die Palmitoylierung – vermittelt durch die Acyltransferase *Porcupine* (Bartscherer and Boutros, 2008) – an einem konservierten Cystein stattfindet und entscheidend für die Hydrophobizität nach Wnt-Sekretion ist. Außerdem zeigen diese Analysen, dass die Glykosylierung der Palmitoylierung vorausgeht und beide Modifikationen für die Sekretion und Funktion von aktiven Wnt-Proteinen essenziell sind. Im Gegensatz zu Wnt-Proteinen ohne Glykosylierung werden nicht palmitoyliertes Wnt-3a und Wnt-5a zwar sezerniert, können jedoch keine Interaktion mit den Wnt-Rezeptoren LRP6 und Fzd5 eingehen, wodurch deren Internalisierung unterbunden wird (Komekado et al., 2007; Kurayoshi et al., 2007).

Anhand ihrer Fähigkeit die Transformation der murinen Brustepithel-Zelllinie C57MG zu induzieren, wurden die Wnt-Proteine in kanonische und nicht-kanonische Wnt-Liganden eingeteilt (Shimizu et al., 1997; Wong et al., 1994). Zu den kanonischen Wnts,

die eine Beteiligung von β -Catenin an der Signaltransduktion implizieren und als hoch transformierend gelten, zählen Wnt-1, Wnt-3, Wnt-3a und Wnt-7. Die nicht-kanonischen Wnts umfassen Wnt-2, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6, Wnt-7b sowie Wnt-11 und vermitteln ein von β -Catenin unabhängiges Signal. Diese werden als schwach oder gar nicht transformierend eingestuft (Kikuchi et al., 2007). Bezüglich der übrigen Wnts wurde keine Aussage getroffen.

Diese strikte Unterteilung ist jedoch mittlerweile nicht mehr haltbar, da unter anderem auch der Rezeptor-Kontext der Zelle einen Einfluss auf die Signalweiterleitung ausübt. So ist beispielsweise kanonisches Wnt-3a in der Lage die Kinase Rock (*Rho-associated kinase*) zu aktivieren (Kishida et al., 2004), die im PCP-Signalweg eine Rolle spielt. Des Weiteren induziert nicht-kanonisches Wnt-5a nach Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren entweder ein kanonisches oder ein nicht-kanonisches Signal (Mikels and Nusse, 2006). Außerdem konkurriert Wnt-5a mit Wnt-3a um die Bindungsstellen von Fzd2 und inhibiert dadurch die Wnt-3a-abhängige Akkumulation von β -Catenin (Sato et al., 2010).

Darüber hinaus fungieren auch die beiden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Ror (*RAR-related orphan receptor*) und Ryk (*related to receptor tyrosine kinase*) als Rezeptoren für Wnt-Liganden (van Amerongen et al., 2008). Während Ror2 über Wnt-5a zur Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signalweges führt (Mikels and Nusse, 2006), vermittelt Ryk durch Interaktion mit Wnt-3a eine Aktivierung der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion (Hendrickx and Leyns, 2008).

B.3.1.2 Dkk-Familie

Zur humanen Familie der Dickkopf (Dkk)-Proteine zählen Dkk-1, Dkk-2, Dkk-3 und Dkk-4, wobei alle Mitglieder außer Dkk-3 die Fähigkeit besitzen, den Wnt-Signalweg zu modulieren (Niehrs, 2006). Dkks sind sezernierte Glykoproteine mit zwei Cysteinreichen Domänen (CRD-1 und CRD-2), wobei CRD-2 in allen vier Dkk-Proteinen hochkonserviert ist und jeweils zehn Cysteine aufweist (Kikuchi et al., 2007).

Dkk-1 gilt als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und interagiert mit den beiden Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6, jedoch nicht mit den Fzd-Rezeptoren. Während die Affinität der LRPs für Wnt gering ist, bindet Dkk-1 mit einer nanomolaren Affinität an LRP6. Diese Bindung zwischen Dkk-1 und LRP6 resultiert in einer sterischen Hinderung der Interaktion mit einem Fzd-Rezeptor, so dass die Signaltransduktion inhibiert wird (Bafico et al., 2001; Semenov et al., 2001). Neben LRP6 fungieren auch die beiden Typ I Transmembranproteine Kremen-1 und Kremen-2 als Rezeptoren für Dkk-1 (Mao et al., 2002). Kremen-2 bildet mit Dkk-1 und LRP6 einen ternären Komplex, induziert dessen Endocytose und führt somit durch die Entfernung von LRP6 von der Zelloberfläche zur Inhibition des Signalweges.

B.3.2 Rezeptoren des Wnt/ β -Catenin-Signalweges

Generell stehen für die Signaltransduktion in das Innere der Zelle im kanonischen Wnt-Signalweg zwei Arten von Rezeptoren auf der Zelloberfläche zur Verfügung: zum einen die Fzd-Rezeptoren und zum anderen die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6.

B.3.2.1 *Frizzled-Rezeptorfamilie*

B.3.2.1.1 *Struktur der Fzd-Rezeptoren*

Die Familie der Frizzled-Rezeptoren umfasst im humanen System 10 Mitglieder, nämlich Fzd1-Fzd10. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sich durch sieben transmembrane Helices auszeichnen, wodurch sie heterotrimere G-Proteine binden und aktivieren können (Malbon, 2004). Die N-terminale Domäne ist extrazellulär und beinhaltet die sogenannte CRD (*cysteine-rich domain*), die zehn konservierte Cysteine aufweist und für die Bindung von Agonisten und Antagonisten benötigt wird (Schulte and Bryja, 2007). An die CRD schließt sich eine hydrophile Linker-Region an. Durch die sieben transmembranen Helices entstehen sowohl drei extrazelluläre als auch drei intrazelluläre *Loops*. Die extrazellulären *Loops* 1 und 2 enthalten zehn konservierte Cystein-Reste, die fünf Disulfidbrücken zwischen den beiden *Loops* ausbilden (Schulte, 2010). Des Weiteren wird eine Beteiligung der extrazellulären *Loops* an der Liganden-Bindung vermutet. Die drei cytoplasmatischen *Loops* und der in der Länge variable C-Terminus, der auch die größten Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Fzds aufweist, sind für die intrazelluläre Kommunikation mit weiteren Komponenten des Signalweges verantwortlich (Wang et al., 2006). Dabei spielt vor allem die in allen 10 Fzds konservierte Aminosäuresequenz KTxxxW im C-Terminus eine wichtige Rolle, welche ein internes PDZ-Bindungsmotiv für Proteine mit einer PDZ-Domäne wie z.B. Dvl darstellt (Schulte, 2010). Eine weitere, weniger stark konservierte Region ist das C-terminale klassische PDZ-Bindungsmotiv S/TxV, das in allen Fzds mit Ausnahme von Fzd3, Fzd6 und Fzd9 vorkommt (Wang et al., 2006).

B.3.2.1.2 *Gewebe-spezifische Expression der Fzd-Rezeptoren*

Alle 10 Fzds konnten in den verschiedensten Geweben nachgewiesen werden und weisen somit ein ubiquitäres Expressionsmuster auf. Zu diesen Geweben zählen unter anderem Magen-Darm-Trakt, Gehirn, Herz, Leber, Lunge, Niere, Pankreas und Skelettmuskel (Kirikoshi et al., 2000; Kirikoshi et al., 1999; Koike et al., 1999; Sagara et al., 1998; Saitoh et al., 2001a, b; Tokuhara et al., 1998; Wang et al., 1997).

B.3.2.1.3 *Funktion und Rolle der Fzd-Rezeptoren*

Fzds spielen eine wichtige Rolle in der Embryogenese, der Zellpolarität und der Zellproliferation (Huang and Klein, 2004). *Loss-of-function* Mutationen können in diesem Zusammenhang zu massiven Beeinträchtigungen führen. So ist ein Fzd5-Knockout im Mausmodell embryonal letal. Mäuse mit einem Knockout von Fzd4 sind dagegen lebensfähig, weisen aber Defekte in der Gefäßbildung der Retina auf. Zudem wurden auch Mutationen im humanen Fzd4 bei der familiären exsudativen Vitreoretinopathie gefunden, einer vererbten Form der Retina-Degeneration (Toomes et al., 2004).

Zur Erfüllung ihrer Aufgaben stehen den Fzd-Rezeptoren unter anderem die beiden beschriebenen nicht-kanonischen Wnt-Wege oder der Wnt/ β -Catenin-Signalweg zur Verfügung. Als Beispiel sei der PCP-Signalweg in *Drosophila* genannt, der dort die Zellpolarität steuert, wobei die asymmetrische subzelluläre Verteilung der Fzds wichtig ist (Adler, 2002). Studien mit *Drosophila*-Zellen in Kultur lieferten zudem erste Hinweise, dass Fzd-Rezeptoren als Wnt-Liganden für den kanonischen Signalweg fungieren und diese mit einer hohen Affinität im nanomolaren Bereich binden (Bhanot et al., 1996; Hsieh et al., 1999; Rulifson et al., 2000). Dies konnte in weiteren Untersuchungen auch für Zellen von Vertebraten gezeigt werden (He et al., 2004).

Dennoch sind die spezifischen Fzd-Wnt-Interaktionen bis heute vor allem in Vertebraten noch weitestgehend ungeklärt, so dass eine Einteilung der Fzds bezüglich ihrer Funktion im nicht-kanonischen und kanonischen Wnt-Signalweg nicht möglich ist. Einige Fzds spielen entweder im nicht-kanonischen oder im kanonischen Wnt-Signalweg eine Rolle (Huang and Klein, 2004). Jedoch scheinen manche Fzds, wie z.B. Fzd7, auch an beiden Signalwegen beteiligt zu sein (Medina et al., 2000). Außerdem kann Fzd5 sowohl mit kanonischem Wnt-3a (Yamamoto et al., 2006) als auch mit nicht-kanonischem Wnt-5a (He et al., 1997) interagieren. Weiterhin wurden Interaktionen für Fzd7 mit Wnt-3, Fzd2 mit Wnt-3a, Fzd4 mit Wnt-5a ebenso wie eine Interaktion der CRD von murinem Fzd6 mit Wnt-4 beschrieben (Chen et al., 2003; Kikuchi et al., 2009; Kim et al., 2008; Lyons et al., 2004; Verkaar et al., 2009).

B.3.2.2 Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6

B.3.2.2.1 Struktur von LRP5 und LRP6

LRP5 und LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) sind Transmembranproteine des Typ I und stellen eine Untergruppe der LDLR (*low-density lipoprotein receptor*)-Familie dar (Brown et al., 1998; Hey et al., 1998). In ihrer Aminosäuresequenz weisen die beiden Wnt-Korezeptoren eine Identität von 71 % auf, begleitet von einer hochkonservierten Domänenstruktur. Diese setzt sich aus einer großen extrazellulären Domäne, einer kleinen Transmembranregion und einer cytoplasmatischen Domäne zusammen (Abb. B-4). Die extrazellulären Domänen von LRP5 und LRP6 sind wiederum aus drei verschiedenen Subdomänen aufgebaut: der YWTD-Typ β -Propeller Domäne, der EGF (*epidermal growth factor*)-ähnlichen Domäne und der LDLR-Typ A Domäne. Die insgesamt vier YWTD-Typ β -Propeller Domänen setzen sich jeweils aus sechs YWTD-Repeats zusammen, die eine sechsflügelige β -Propeller-Struktur bilden. Jede dieser β -Propeller-Domänen ist gepaart mit einer C-terminal liegenden EGF-ähnlichen Domäne, die je sechs konservierte Cystein-Reste aufweist. Der letzten EGF-ähnlichen Domäne folgen drei LDLR-Typ A Domänen, die ebenfalls sechs konservierte Cystein-Reste und zusätzlich das Aminosäuremotiv SDE tragen. Die extrazellulären Domänen der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 beinhalten sechs bzw. zehn potenzielle N-Glykosylierungsstellen, wobei fünf der zehn Stellen von LRP6 in LRP5 konserviert sind. Außerdem verfügen sie über mehrere Bindestellen für Liganden wie Dkk-1 und Wnt-3a

(Bourhis et al., 2010; Cheng et al., 2011; Williams and Insogna, 2009). In der cytoplasmatischen Domäne beider Wnt-Korezeptoren finden sich fünf Prolin-Serinreiche Motive, PPPSPxS A-E (S = Serin oder Threonin; x = beliebige Aminosäure), die für die Signalweiterleitung wichtige Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Brown et al., 1998). Vor dem ersten PPPSPxS-Motiv befindet sich außerdem ein Serin/Threonin (S/T)-Cluster. Ein wesentlicher Unterschied zu den anderen Mitgliedern der LDLR-Familie besteht darin, dass weder LRP5 noch LRP6 das konservierte Internalisierungsmotiv NPXY tragen. Stattdessen weisen aber beide Rezeptoren ein Dileucin- und ein YRPY-Motiv auf, die an Internalisierungsreaktionen beteiligt sein können (Brown et al., 1998).

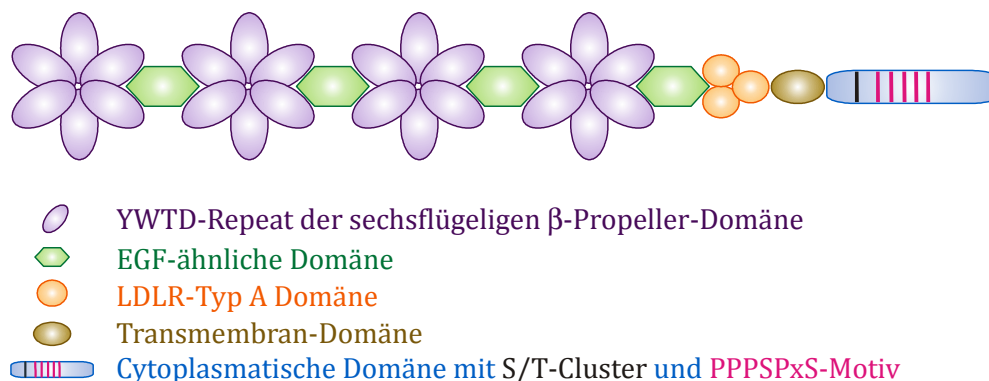


Abb. B-4: Molekularer Aufbau der LRP-Rezeptoren.

Die extrazelluläre Domäne umfasst die sechsfügeligen YWTD- β -Propeller-Domänen, die EGF-ähnlichen Domänen und die LDLR-Typ A Domänen. Daran schließt sich eine kleine Transmembran-Domäne gefolgt von der cytoplasmatischen Domäne mit dem S/T-Cluster und den fünf PPPSPxS-Motiven an (Brown et al., 1998; Hey et al., 1998).

B.3.2.2.2 Gewebe-spezifische Expression der LRPs

Analog zu den Fzds weisen sowohl LRP5 als auch LRP6 ein ubiquitäres Expressionsmuster auf, wobei sie größtenteils koexprimiert werden (He et al., 2004). Das höchste Expressionslevel von LRP5 ist in der Leber zu finden, gefolgt von Pankreas, Prostata, Plazenta und Dünndarm. Außerdem wird LRP5 in Herz, Lunge, Skelettmuskeln, Niere und weiteren Geweben exprimiert. Die niedrigste Expression von LRP5 findet man im Gehirn und in peripheren Leukozyten (Hey et al., 1998). LRP6 weist hohe Expressionslevel in Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Pankreas und weiteren Geweben auf. Niedrige Level an LRP6 sind unter anderem in Leber, Skelettmuskeln und Prostata zu finden (Brown et al., 1998).

B.3.2.2.3 Funktion und Rolle der LRPs

Die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 sind von entscheidender Bedeutung für die Embryogenese, die Knochenbildung, die Entwicklung der Augen sowie für den Glucose-Metabolismus (Holmen et al., 2004; Li and Bu, 2004; Liu et al., 2012). Genetische Studien in *Drosophila*, *Xenopus* und Mäusen belegen, dass sowohl LRP5 als auch LRP6 eine entscheidende Funktion im Wnt-Signalweg ausüben.

Im Gegensatz zu den Fzd-Rezeptoren, die in verschiedenen Wnt-Signalwegen eine Rolle spielen, scheinen die beiden LRPs aber ausschließlich für den Wnt/ β -Catenin-Signalweg von essenzieller Bedeutung zu sein (He et al., 2004). Während nämlich eine Fzd5-Mutante, die nur die entsprechende Ektodomäne enthält (hFzd5N) (He et al., 1997), sowohl den PCP-Weg als auch die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion hemmt, führt ein mutiertes LRP6-Protein, dem die intrazelluläre Domäne fehlt (LRP6 Δ C) (Tamai et al., 2000), ausschließlich zur Hemmung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Semenov et al., 2001). Ein LRP6-Protein, in dem die Serin/Threonin-Reste aller fünf PPPSPxS-Motive durch Alanin substituiert sind (LRP6mS/T \rightarrow A), und die sekretierte extrazelluläre Domäne von LRP5 (LRP5N), blockieren ebenfalls den kanonischen Wnt-Signalweg (Mao et al., 2001; Tamai et al., 2004). Dabei geht man davon aus, dass LRP5N die Blockade durch das Abfangen von Wnt-Liganden vermittelt (Mao et al., 2001).

Gegenläufig verhält es sich mit mutierten LRP5- und LRP6-Proteinen, die keine extrazelluläre Domäne aufweisen (LRP5 Δ N und LRP6 Δ N) und den Wnt/ β -Catenin-Signalweg konstitutiv aktivieren (Liu et al., 2003; Mao et al., 2001). Somit scheinen die LRPs den kanonischen Wnt-Weg unabhängig von Fzds aktivieren zu können. Interessanterweise ist ein einziges PPPSPxS-Motiv (Motiv A) zur Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges ausreichend, wie dessen Übertragung auf ein mutiertes LDLR Δ N-Protein zeigte (Tamai et al., 2004). Darüber hinaus ist auch jedes einzelne der vier weiteren PPPSPxS-Motive (B-E) in der Lage, die Signaltransduktion zu vermitteln, wobei sich die Signalaktivität der fünf Motive aber deutlich voneinander unterscheidet (MacDonald et al., 2008). Für eine effiziente Signaltransduktion sind aber mindestens zwei PPPSPxS-Motive nötig (Wolf et al., 2008). In der nachfolgenden Abb. B-5 sind die verschiedenen LRP-Mutanten und ihr Signalverhalten dargestellt.

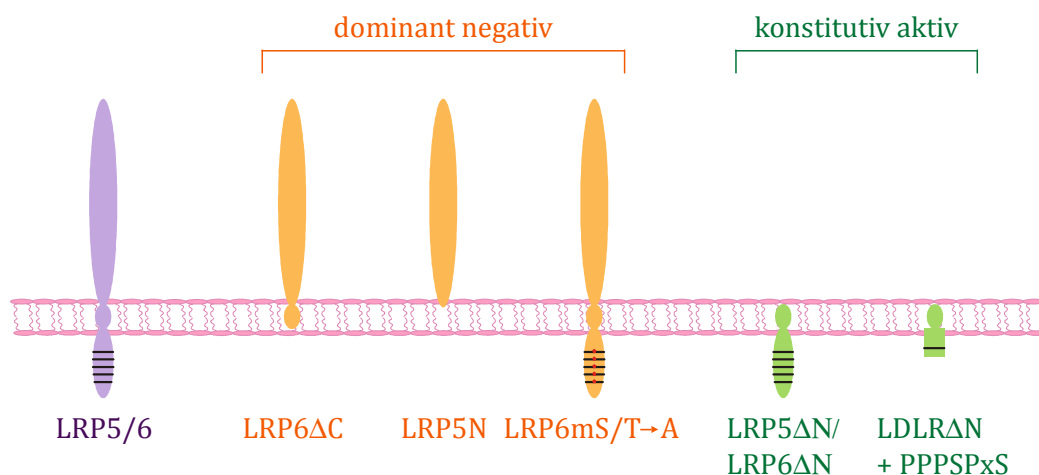


Abb. B-5: Schematische Darstellung verschiedener mutierter LRP-Proteine und ihrer Eigenschaften bezüglich der Signaltransduktion.

Die mutierten LRP-Proteine sind im Vergleich zum Wildtyp-Protein (lila) abgebildet. Zu den LRP-Mutanten, die dominant negativ wirken (orange) und den Signalweg somit inhibieren, gehören LRP6 Δ C, LRP5N und LRP6mS/T \rightarrow A (Substitution der S/T-Reste der PPPSPxS-Motive durch Alanin; gekennzeichnet durch rote Punkte). Mutanten, die den Signalweg in Abwesenheit von Wnt konstitutiv aktivieren (grün), umfassen neben LRP5 Δ N und LRP6 Δ N auch einen N-terminal verkürzten LDLR, dem ein einziges PPPSPxS-Motiv übertragen wurde (Liu et al., 2003; Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001; Tamai et al., 2004).

Knockout-Studien mit Mäusen weisen darauf hin, dass LRP5 und LRP6 die Funktion des jeweils anderen Rezeptors nicht vollständig übernehmen können, da der Knockout von LRP5 bzw. LRP6 mit unterschiedlichen Phänotypen assoziiert ist. So sind LRP5-Knockout-Mäuse zwar lebensfähig, leiden aber im Erwachsenenalter unter Osteoporose und metabolischen Störungen wie einer verminderten Glucose-Toleranz (Fujino et al., 2003; Kato et al., 2002). Im Gegensatz dazu sind Mäuse mit einem LRP6-Knockout perinatal letal und weisen schwerwiegende Abnormalitäten in der Entwicklung wie z.B. Defekte der Gliedmaßen oder Missbildungen des Urogenitaltrakts auf (Pinson et al., 2000). Ähnliche Entwicklungsdefekte treten auch nach Mutation von Wnt-1, Wnt-3a und Wnt-7a auf (Pinson et al., 2000). LRP5 und LRP6 Doppel-Knockout-Mäuse sind ebenfalls perinatal letal, können keinen Primitivstreifen ausbilden und haben kein Mesoderm, wodurch sie phänotypisch Wnt-3- bzw. β -Catenin-Knockout-Mäusen ähnlich sind (Cadigan and Liu, 2006; Kelly et al., 2004). Diese Studien weisen darauf hin, dass LRP6 im Vergleich zu LRP5 eine prominente Rolle in der Embryonalentwicklung zukommt.

Mutationen in den LRPs sind auch beim Menschen mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. So führt eine *loss-of-function* Mutation in LRP5 zu OPPG (*osteoporosis pseudoglioma syndrome*), einer schweren Form der Osteoporose, die auch mit einer Erblindung einhergeht (Gong et al., 2001). Interessanterweise wird die familiäre exsudative Vitreoretinopathie neben einer Mutation in Fzd4 ebenfalls mit einer *loss-of-function* Mutation von LRP5 in Verbindung gebracht und geht dabei mit einer erniedrigten Knochenmasse einher (Toomes et al., 2004). Eine *gain-of-function* Mutation von LRP5 ist mit dem HBM (*high-bone mass*)-Syndrom assoziiert, das sich in einer Erhöhung der Knochendichte äußert (Boyden et al., 2002; Little et al., 2002). Alternatives Splicing von LRP5 führt ebenfalls zu einer *gain-of-function* Mutation von LRP5, die in hyperparathyroiden Tumoren mit einer vermehrten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges verbunden ist (Bjorklund et al., 2007). Für LRP6 ist eine *loss-of-function* Mutation beschrieben, die mit einer frühen Form der koronaren Herzkrankheit sowie Osteoporose assoziiert ist (Mani et al., 2007).

Die genaue Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 hinsichtlich der Signalweiterleitung im Wnt/ β -Catenin Signalweg konnte bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Dennoch ist bereits bekannt, dass beide Rezeptoren mit unterschiedlichen Wnt-Liganden Bindungen eingehen können. So wurde für LRP5 eine Interaktion mit Wnt-1 und Wnt-4 beschrieben, während LRP6 Wnt-1, Wnt-3a und Wnt-9b binden kann (Bourhis et al., 2010; Kato et al., 2002; Liu et al., 2003; Tamai et al., 2000). Basierend auf den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Modelle für die Signaltransduktion durch die LRPs in Kombination mit Fzd und Wnt beschrieben.

B.3.2.3 Signaltransduktion über Fzds und LRPs

Generell geht man davon aus, dass für eine effektive Signaltransduktion Interaktionen beider Rezeptor-Typen nötig sind (Schweizer and Varmus, 2003). Die verschiedenen

Modelle, die die Signalweiterleitung nach Bindung eines Wnt-Liganden beschreiben, weisen als Gemeinsamkeit einen essenziellen Schritt auf: die Phosphorylierung der PPPSPxS-Motive und des S/T-Clusters der intrazellulären LRP-Domäne, was letztendlich zur Stabilisierung von β -Catenin und dessen Translokation in den Nukleus führt.

B.3.2.3.1 LRP-Phosphorylierung

Die Erkenntnisse bezüglich der Phosphorylierungsreaktionen der intrazellulären LRP-Domäne basieren vor allem auf Analysen mit LRP6. Im Folgenden genannte Aminosäurereste sind spezifisch für LRP6, wobei in LRP5 ähnliche Reste für die Phosphorylierung zur Verfügung stehen.

Bei den PPPSPxS-Motiven unterscheidet man die PPPSP-Sequenz von der CKI-Konsensus-Sequenz xS. Nach Wnt-Bindung erfolgt eine sequenzielle Phosphorylierung durch zwei unterschiedliche membrangebundene Kinasen (Abb. B-6). Zunächst wird innerhalb des PPPSPxS-Motivs A die PPPSP-Sequenz durch die Prolin-gerichtete GSK-3 β an S1490 phosphoryliert, wobei Axin für die Rekrutierung der GSK-3 β verantwortlich ist (Zeng et al., 2005). Die Phosphorylierung der PPPSPxS-Motive C und E wird ebenfalls durch GSK-3 β vermittelt (MacDonald et al., 2008). Für die Motive B und D konnten keine Phosphorylierungsspezifischen Antikörper generiert werden (MacDonald et al., 2008). Caprin-2, ein cytoplasmatisches Protein in Vertebraten, kann LRP6 binden und dadurch dessen Phosphorylierung durch GSK-3 β erleichtern (Ding et al., 2008). Dieser Phosphorylierungsschritt stellt die Voraussetzung für die effiziente Phosphorylierung von T1493 der xS-Sequenz durch die nicht Prolin-gerichtete Kinase CKI γ dar (Davidson et al., 2005; Zeng et al., 2005).

CKI γ ist ebenfalls für die Phosphorylierung von T1479 des S/T-Cluster verantwortlich. Die Anwesenheit des phosphorylierten S/T-Clusters ist entscheidend für die Phosphorylierung von S1490 der PPPSP-Sequenz und damit für die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges. Man geht davon aus, dass der phosphorylierte S/T-Cluster als Bindungsstelle für GSK-3 β dient und dadurch die Phosphorylierung der PPPSPxS-Motive fördert (Yum et al., 2009). Während die Phosphorylierungen an T1479 und T1493 durch die CKI γ strikt Wnt-abhängig sind, werden die PPPSP-Sequenzen sowohl in Abhängigkeit von Wnt als auch konstitutiv phosphoryliert (Niehrs and Shen, 2010). Diese Phosphorylierungsreaktionen finden innerhalb von zehn Minuten nach Wnt-Stimulation statt und sind entscheidend für die weitere Signaltransduktion, da sie die Voraussetzung für die Rekrutierung von Axin darstellen (Cadigan and Liu, 2006).

Eine weitere Kinase, die die intrazelluläre LRP6-Domäne an den weiter N-terminal gelegenen Serinresten S1420 und S1430 phosphorylieren kann (Abb. B-6), ist CKI ϵ (Swiatek et al., 2006). Jedoch führen diese Phosphorylierungen zu einer Hemmung des Wnt-Signalweges. Da CKI ϵ auch die einzelnen Komponenten des Degradationskomplexes phosphorylieren kann und somit den Abbau von β -Catenin vermindert, vermutet man, dass CKI ϵ sowohl einen negativen als auch einen positiven Einfluss auf den kanonischen Wnt-Weg ausübt (Gao et al., 2002). Interessanterweise ist S1430 in

LRP5 und LRP6 konserviert, wohingegen S1420 spezifisch für LRP6 ist. Derartige Unterschiede in der Aminosäuresequenz könnten die Ursache für die verschiedenen Funktionen von LRP5 und LRP6 *in vivo* darstellen (Swiatek et al., 2006).

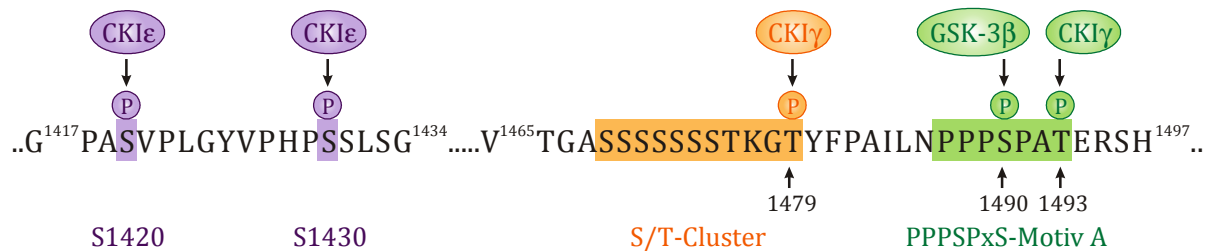


Abb. B-6: Phosphorylierungsreaktionen an LRP6 nach Bindung eines Wnt-Liganden.

S1490 des PPPSPxS-Motivs A wird durch die GSK-3β phosphoryliert, was die Phosphorylierung von T1493 durch die CKIγ ermöglicht. Voraussetzung für diese aktivierenden Phosphorylierungen ist ein an T1479 phosphorylierter S/T-Cluster. Im Gegensatz dazu üben die Phosphorylierungen von S1420 und S1430 durch die CKIε einen inhibitorischen Effekt aus. (Davidson et al., 2005; Swiatek et al., 2006; Zeng et al., 2005)

B.3.2.3.2 Modelle für die Signaltransduktion

Nachfolgend sind die wichtigsten Modelle für die Signalweiterleitung durch Fzd und LRP beschrieben. Dabei ist entscheidend, dass sich die einzelnen Modelle nicht unbedingt gegenseitig ausschließen.

Zwei-Signal-Modell

Ein Modell für die Signalweiterleitung durch die Rezeptoren Fzd und LRP ist das Zwei-Signal-Modell (Cadigan and Liu, 2006). Dabei geht man davon aus, dass durch einen Wnt-Liganden die Bildung eines heterodimeren Fzd-LRP-Komplexes gefördert wird, der zwei separate Signale im Cytoplasma zur Stabilisierung von β-Catenin weiterleitet. Die beiden Signale werden als „LRP/Axin-Zweig“ und „Fzd/Dvl-Zweig“ bezeichnet.

Der „LRP/Axin-Zweig“ vermittelt das erste Signal, die zweifache Phosphorylierung der intrazellulären PPPSPxS-Motive der LRPs. Daraufhin kann Axin rekrutiert werden, wobei die zweifach phosphorylierten PPPSPxS-Motive von LRP5 (Mao et al., 2001) bzw. LRP6 (Tamai et al., 2004) als Bindungspartner für Axin dienen, welches entweder inaktiviert oder abgebaut wird. Da Axin nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommt, geht man davon aus, dass dessen Translokation an die Membran die Degradation von β-Catenin blockiert (Lee et al., 2003).

Das zweite Signal erfolgt über den „Fzd/Dvl-Zweig“. Dabei handelt es sich um die Fzd-abhängige Phosphorylierung von Dvl (Cadigan and Liu, 2006), für die eine Beteiligung von trimeren G-Proteinen vermutet wird (Katanaev et al., 2005).

In der Tat konnte eine Beteiligung des Go-Proteins an der Wnt-Signaltransduktion gezeigt werden (Egger-Adam and Katanaev, 2010). Die Untereinheit Gαo bindet Axin über dessen N-terminale RGS (*regulator of G protein signaling*)-Domäne und trägt zu dessen Rekrutierung an die Zellmembran bei. Außerdem vermittelt die Gβγ-Komponente durch Bindung an Dvl dessen Lokalisierung an die Zellmembran, wo Dvl nach Aktivierung mit der DIX-Domäne von Axin interagieren kann.

Initiations-Amplifikations-Modell

Das Initiations-Amplifikations-Modell beschreibt eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung des Wnt-Rezeptor-Komplexes (Huang and He, 2008; Zeng et al., 2008). Dabei geht man davon aus, dass für die Initiation sowohl Fzd als auch LRP nötig sind, wohingegen die Amplifikation lediglich von LRP abhängig ist.

In der Initiationsphase induziert ein Wnt-Ligand die Bildung eines Fzd-LRP-Komplexes. Fzd rekrutiert Dvl über die PDZ-Domäne und Dvl wiederum rekrutiert den Axin-GSK-3 β -Komplex, der die initiale Phosphorylierung der PPPSPxS-Motive fördert.

Die Amplifikationsphase zeichnet sich dadurch aus, dass die phosphorylierten PPPSPxS-Motive von LRP als Bindungsstelle für Axin fungieren. Somit werden nach der Initiation durch LRP selbst weitere Axin-GSK-3 β -Komplexe rekrutiert, welche für die weitere Phosphorylierung der PPPSPxS-Motive von LRP verantwortlich sind. MACF1 (*microtubule actin cross-linking factor 1*) assoziiert mit dem cytosolischen Axin-Komplex, der APC enthält, und trägt möglicherweise zur Rekrutierung des Axin-GSK-3 β -Komplexes (ohne APC) bei (Chen et al., 2006). Diese Funktion scheint allerdings spezifisch für Vertebraten zu sein (MacDonald et al., 2009).

Rezeptor-Aggregations-Modell

Die Grundlage für das Rezeptor-Aggregations-Modell ist die Fähigkeit der dynamischen Polymerisation von Dvl, die durch dessen DIX-Domäne vermittelt wird (Schwarz-Romond et al., 2007a). Nach Wnt-Bindung und der damit assoziierten Entstehung eines heterodimeren Rezeptorkomplexes wird Dvl rekrutiert. Die nachfolgende Dvl-Polymerisation führt zur Aggregation der einzelnen Fzd-LRP-Rezeptorkomplexe, an die sich die Rekrutierung von Axin über die Dvl-Polymere (Schwarz-Romond et al., 2007b) und die Phosphorylierung von LRP anschließt (Huang and He, 2008; MacDonald et al., 2009). Der somit entstandene Multiproteinkomplex wird als Signalosom bezeichnet. Dieses Modell wird durch verschiedene Studien gestützt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Oligomerisation von Fzd und LRP zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges führt, auch wenn eine solche Reaktion bisher nicht *in vivo* gezeigt werden konnte (Cong et al., 2004). Zum anderen führt Wnt in einer Dvl-abhängigen Weise zur Aggregation von LRP6 in LRP6-Signalosomen, die neben LRP6 auch Fzd, Axin und GSK-3 β enthalten (Bilic et al., 2007). Dabei geht man davon aus, dass die LRP6-Cluster Axin rekrutieren und die Phosphorylierung von T1479 induzieren.

Kinase-vermitteltes Aggregationsmodell

Das Kinase-vermittelte Aggregationsmodell beschreibt die Wnt-abhängige Bildung von PIP₂ durch die Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase Typ I (PIP5KI), deren Aktivität über die Interaktion von Fzd und Dvl reguliert wird (MacDonald et al., 2009). PIP₂ scheint für die Aggregation von LRP6 und dessen Phosphorylierung zwar nötig, aber nicht ausreichend zu sein, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist (Pan et al., 2008). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Amer1/WTX (*adenomatous polyposis coli membrane recruitment 1/Wilms tumor gene on the X chromosome*) in Abhängigkeit von PIP₂ an die Membran lokalisiert, wobei es die

Phosphorylierung von LRP6 durch Rekrutierung des Axin-GSK-3 β -Komplexes und Bindung von CKI γ fördert (Tanneberger et al., 2011). Möglicherweise trägt auch Caprin-2 über seine Oligomerisations-Domäne zur Aggregation von LRP6 und dessen anschließender Assoziation mit dem Axin-GSK-3 β -Komplex bei (Ding et al., 2008).

B.3.3 Signalweg im Cytoplasma – Modifikation von β -Catenin

Die Signalprozesse im Cytoplasma dienen der Regulation der β -Catenin Konzentration. Strukturell (Abb. B-7) zeichnet sich β -Catenin vor allem durch 12 *Armadillo repeats* aus, die aus α -Helices aufgebaut und entsprechend dem Ortholog *Armadillo* von *D. melanogaster* benannt sind. Dabei handelt es sich um nicht exakt konservierte Sequenzmotive mit einer Länge von 42 Aminosäuren, die als Interaktionspartner für verschiedene Proteine fungieren. Interessanterweise sind entsprechende *Armadillo repeats* auch in nicht verwandten Proteinen wie z.B. APC zu finden. Die N-terminale Domäne weist mehrere potenzielle Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsstellen auf, während der C-Terminus eine Transaktivierungsdomäne enthält (Willert and Nüsse, 1998).

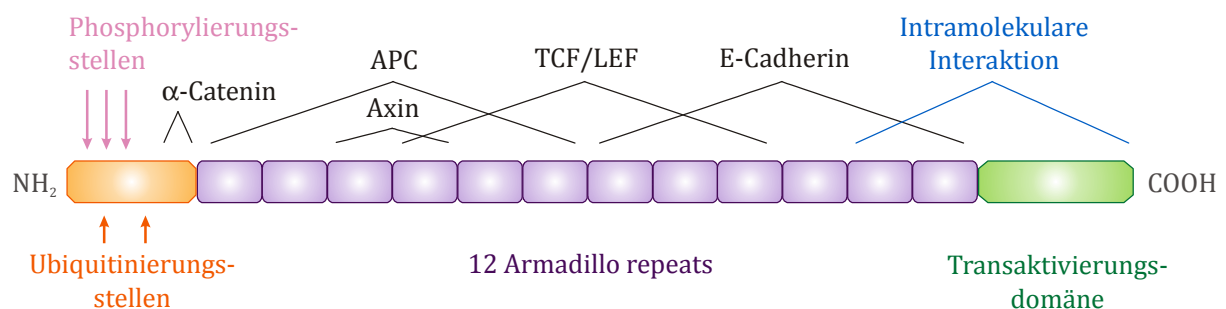


Abb. B-7: Molekularer Aufbau von β -Catenin.

Am N-Terminus liegen die Phosphorylierungsstellen für GSK-3 β und CKI α sowie Ubiquitinierungsstellen für den E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex. Die zentrale Einheit stellen die 12 *Armadillo repeats* dar, die als Bindestellen für die Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen dienen. Der C-Terminus verfügt über eine Transaktivierungsdomäne und ist an intramolekularen Interaktionen beteiligt. (modifiziert nach Willert and Nüsse, 1998)

β -Catenin spielt eine wichtige Rolle bei zwei unterschiedlichen zellulären Prozessen. Zum einen dient β -Catenin in den *adherence junctions* als Interaktionspartner für Cadherine und α -Catenin, welches eine Verbindung zum Aktin-Cytoskelett darstellt, und somit zur Zell-Zell-Adhäsion beiträgt (Perez-Moreno and Fuchs, 2006). Zum anderen aktiviert es im Komplex mit TCF/LEF die Transkription von Wnt-Zielgenen (Willert and Nüsse, 1998).

Für β -Catenin sind fünf verschiedene molekulare Formen beschrieben (Abb. B-8), die sich hinsichtlich der Interaktionspartner und den damit verbundenen Funktionen voneinander unterscheiden. Die unterschiedlichen Formen tragen dazu bei, dass Zell-Zell-Adhäsion und Signaltransduktion nicht immer gekoppelt sind, sondern vielmehr eine getrennte Regulation der beiden Funktionen möglich ist (Gottardi and Gumbiner, 2004).

Die N-terminal phosphorylierte Form von β -Catenin entsteht unter dem Einfluss des Degradationskomplexes und unterliegt dem Abbau durch das Proteasom (Polakis, 1999). Davon unterscheidet man die geschlossene Konformation, die nach Wnt-Bindung durch eine intramolekulare Interaktion des C-Terminus mit den C-terminal liegenden *Armadillo repeats* entsteht (Cox et al., 1999). Diese Konformation führt zur Translokation in den Zellkern und nach Assoziation mit TCF/LEF wird dadurch die Transkription von Wnt-Zielgenen initiiert. Im Gegensatz dazu steht die dimerisierte Form von β -Catenin und α -Catenin für Adhäsions-Prozesse zur Verfügung, da die transkriptionelle Aktivität von β -Catenin durch α -Catenin inhibiert wird (Giannini et al., 2000). Dennoch kann diese Form neben Cadherinen auch mit TCF/LEF interagieren. Die offene Form befähigt β -Catenin sowohl zur Interaktion mit Cadherinen als auch mit TCF/LEF, so dass β -Catenin in Abhängigkeit von der Konzentration der Bindungspartner entweder für Adhäsions- oder Transkriptionsprozesse zur Verfügung steht (Gottardi and Gumbiner, 2004). In der inaktiven Form ist β -Catenin weder an Adhäsionsprozessen noch an der Transkriptionsregulation beteiligt (Gottardi et al., 2001).

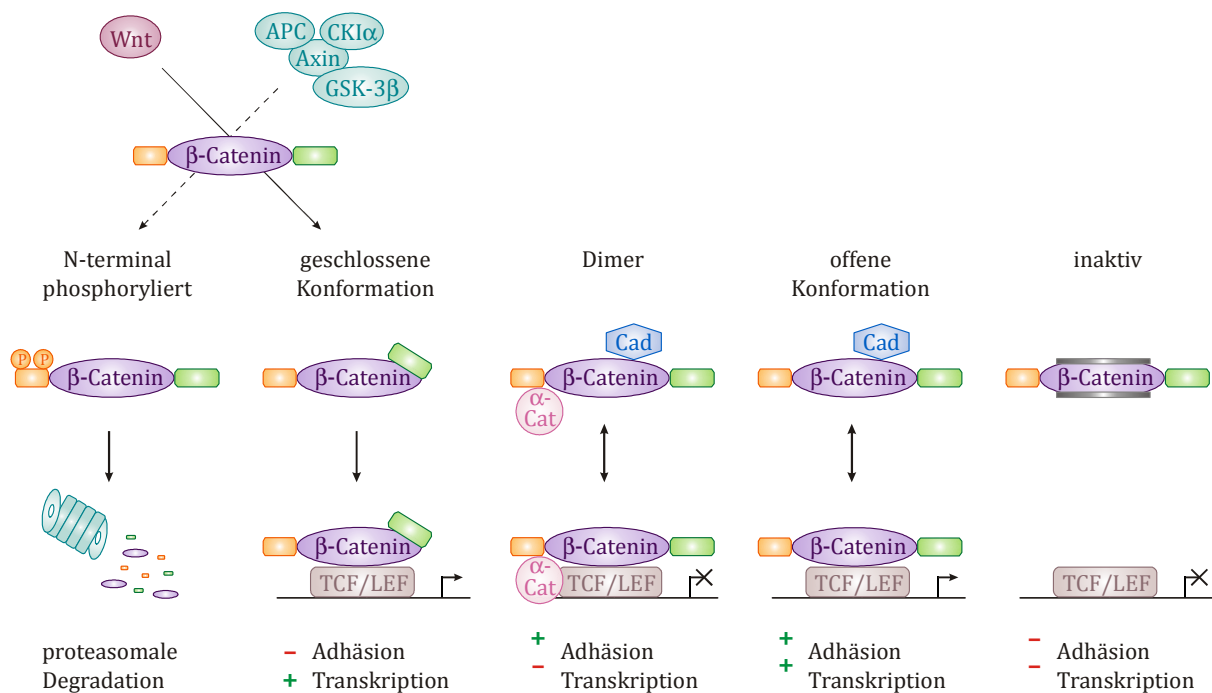


Abb. B-8: Konformationen von β -Catenin und deren Eigenschaften.

In Abwesenheit eines Wnt-Liganden wird β -Catenin durch den Degradationskomplex N-terminal phosphoryliert und nach Ubiquitinierung durch das Proteasom abgebaut. Nach Wnt-Stimulation kann der C-Terminus von β -Catenin mit dessen C-terminalen *Armadillo repeats* interagieren, wodurch die geschlossene Konformation entsteht, die an TCF/LEF bindet. Das Dimer aus β -Catenin und α -Catenin steht nur für Adhäsionsprozesse zur Verfügung. In der offenen Konformation ist β -Catenin sowohl an der Signalweiterleitung als auch an der Adhäsion beteiligt. Die inaktive Form von β -Catenin steht für keinen der beiden Prozesse zur Verfügung. (modifiziert nach Gottardi and Gumbiner, 2004)

In Abwesenheit von Wnt-Liganden ist das Level an cytoplasmatischem β -Catenin in der Zelle gering, da es der Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg unterworfen ist (Kikuchi et al., 2006). Dabei sind vor allem die Phosphorylierungen in der N-terminalen

Sequenz D³²SGXXSXXXTXXXS⁴⁵ von β -Catenin entscheidend. Die Phosphorylierung von Ser⁴⁵ durch CKI α ist essenziell für die nachfolgende Phosphorylierung von Thr⁴¹, Ser³⁷ und Ser³³ durch GSK-3 β . Die phosphorylierten Aminosäurereste Ser³³ und Ser³⁷ vermitteln die Interaktion von β -Catenin mit dem F-Box Protein β -TrCP des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes, das die Ubiquitinierung und die nachfolgende Degradation von β -Catenin durch das Proteasom induziert (Kikuchi et al., 2006; Polakis, 2002). Diese Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsreaktionen werden durch den Tumorsuppressor Amer1/WTX gefördert, der als neue Komponente des Degradationskomplexes entdeckt wurde, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht bekannt ist (Huang and He, 2008; Regimbald-Dumas and He, 2011).

Diese notwendigen Phosphorylierungen können nur im Degradationskomplex erfolgen, der die räumliche Nähe aller erforderlichen Proteine gewährleistet, wobei Axin und APC von entscheidender Bedeutung sind. Axin besitzt die Fähigkeit mit verschiedenen Proteinen des Wnt-Signalweges zu interagieren, unter anderem mit APC, GSK-3 β und CKI α . Dadurch wird die erforderliche Nähe zu β -Catenin hergestellt, das ebenfalls von Axin gebunden wird. Im Komplex wird Axin selbst durch die Axin-gebundene GSK-3 β phosphoryliert, was zur Stabilisierung von Axin führt. Die Axin-GSK-3 β -Interaktion wird aber durch ein weiteres neu identifiziertes Protein, die Protein Phosphatase 1 (PP1), reduziert, indem PP1 mit Axin interagiert und es dephosphoryliert (Luo et al., 2007). Dadurch trägt PP1 zur Inhibition der β -Catenin-Degradation bei. APC wird durch CKI α und auch GSK-3 β phosphoryliert, was die Bindung von β -Catenin an APC verstärkt und Axin freisetzt, um ein neues β -Catenin-Molekül zu binden (Kimelman and Xu, 2006; Willert and Jones, 2006). Mutationen der β -Catenin- oder Axin-Bindestelle von APC bewirken, dass APC nicht zur Degradation von β -Catenin beitragen kann (Kawahara et al., 2000). Diese Mutationen sind aufgrund einer Destabilisierung des Degradationskomplexes ebenso wie die mit familiärem und sporadischem Darmkrebs verbundenen APC-Mutationen mit hohen Levels an β -Catenin und transkriptionell konstitutiv aktiven TCF/LEF-Komplexen assoziiert (Kikuchi et al., 2006), was zu einem deutlich erhöhten Proliferationsvermögen der betroffenen Zellen führt (Segditsas and Tomlinson, 2006).

B.3.4 Signalweiterleitung im Nukleus

Infolge der Aktivierung des Wnt-Signalweges durch einen Wnt-Liganden kommt es zu einer Deassemblierung des Degradationskomplexes, was in der Stabilisierung von β -Catenin und dessen Akkumulation im Cytoplasma resultiert. Anschließend erfolgt die Translokation von β -Catenin in den Nukleus, wobei der zugrunde liegende Import- und Export-Mechanismus bislang nicht vollständig aufgeklärt ist. β -Catenin besitzt weder ein *nuclear localization signal* (NLS) (Henderson and Fagotto, 2002), noch verfügt es über ein *nuclear export signal* (NES) (Wiechens and Fagotto, 2001). Die Translokation von β -Catenin in den Zellkern erfolgt unabhängig von Transportfaktoren wie Importinen, wobei β -Catenin direkt mit dem *nuclear pore complex* (NPC) interagiert und dabei mit Importin- β um Bindestellen des NPC konkurriert (Fagotto et al., 1998; Yokoya et al., 1999). Bezüglich des nukleären Exports von β -Catenin wird eine Beteiligung von APC

und Axin propagiert, da beide zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma pendeln können (Cong and Varmus, 2004; Henderson, 2000; Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Die Translokation von APC in den Nukleus über den Importin- α/β -Weg wird vor allem durch zwei NLSs ermöglicht. Der Export von APC und auch Axin erfolgt mittels NESs über den CRM1 (*chromosome region maintenance 1*)/Exportin-Weg (Cong and Varmus, 2004; Henderson and Fagotto, 2002). Gegen eine Beteiligung von APC am Transport von β -Catenin spricht jedoch, dass β -Catenin unabhängig von APC zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma translozieren kann (Eleftheriou et al., 2001; Hendriksen et al., 2005; Wiechens and Fagotto, 2001). Man geht daher davon aus, dass die subzelluläre Verteilung von β -Catenin zwischen dem Nukleus und dem Cytoplasma durch Retention reguliert wird, wobei β -Catenin mit Proteinen des entsprechenden Kompartiments interagiert (Jamieson et al., 2012; Kriehoff et al., 2006).

An der nukleären Lokalisation von β -Catenin sind außerdem die nukleären Proteine Lgs (*legless*) mit dem humanen Ortholog Bcl (*b-cell lymphoma*)-9 (Kramps et al., 2002) und Pygopus (Pygo) mit den zwei humanen Orthologen hPygo1 und hPygo2 (Thompson et al., 2002) beteiligt. Darüber hinaus scheinen diese Proteine auch für die transkriptionelle Funktion von β -Catenin entscheidend zu sein, indem Bcl-9/Lgs als Interaktionspartner von β -Catenin und Pygo fungiert, wobei β -Catenin an TCF/LEF-Proteine gebunden ist (Kramps et al., 2002).

Die Transkription von Zielgenen wird durch Assoziation mit Mitgliedern der TCF/LEF-Familie wie LEF-1 reguliert (Behrens et al., 1996). In Vertebraten gehören neben LEF-1 auch TCF-1, TCF-3 und TCF-4 zu dieser Familie, bei der es sich um eine Untergruppe der HMG (*high mobility group*)-Box enthaltenden Transkriptionsfaktoren handelt (Shitashige et al., 2008). TCF/LEFs weisen zwar DNA-Bindungseigenschaften auf, sind aber nur durch Interaktion mit weiteren Kofaktoren in der Lage die Transkription zu aktivieren. Über ihre HMG-Domäne binden sie an spezifische DNA-Regionen mit der Konsensus-Sequenz AGATCAAAGGG (Hurlstone and Clevers, 2002), wobei sie in Abwesenheit von β -Catenin mit Korepressoren wie CtBP und Groucho/TLE1 (*transducin-like enhancer of split 1*) Komplexe ausbilden und somit die Transkription unterbinden (Hoppler and Kavanagh, 2007). Die Interaktion von TCF mit Groucho erfolgt über dessen Q-Domäne mit einer konservierten Region der TCFs, die sich zwischen der Bindedomäne für β -Catenin und der HMG-Box befindet. Die Repression von TCF/LEF-Zielgenen wird primär über den Korepressor Groucho vermittelt, der unter anderem Histondeacetylasen rekrutiert, die über die Eliminierung von Acetylgruppen der Histone die Chromatin-Struktur so modifizieren, dass die Transkription aufgrund dicht gepackter DNA blockiert wird (Hurlstone and Clevers, 2002).

Zur Initiation der Transkription bindet β -Catenin mit den *Armadillo repeats* 3-10 an die ersten 50 Aminosäuren der TCF/LEF-Proteine. β -Catenin fungiert somit als Gerüst, das die Transkriptionsfaktoren an spezifische *chromatin remodeling*-Komplexe sowie die Wnt-Koaktivatoren Bcl-9/Lgs und Pygo bindet. Dabei findet eine direkte Interaktion des

N-terminalen *Armadillo repeat* von β -Catenin mit Bcl-9/Lgs statt, was wiederum die Assoziation von Lef-1 mit Pygo vermittelt. Der C-Terminus von β -Catenin weist eine sehr starke Aktivierungsdomäne auf, die an mehrere *chromatin remodeling*-Untereinheiten bindet. Die konzertierte Aktion von Histonacetyltransferasen und *chromatin remodeling*-Komplexen führt zu einer offenen Chromatin-Struktur und einer damit verbundenen transkriptionellen Aktivierung von Wnt-Zielgenen (Hoppler and Kavanagh, 2007; Hurlstone and Clevers, 2002; Willert and Jones, 2006).

Somit ist nukleäres β -Catenin für die Regulation der Funktion der TCF/LEFs zuständig. Hierbei wird gesteuert, ob die Transkriptionsfaktoren in Abwesenheit eines Wnt-Signals in β -Catenin-freien Komplexen als transkriptionelle Repressoren oder nach Wnt-Stimulation in β -Catenin-enthaltenden Komplexen als Aktivatoren der Transkription agieren (Hoppler and Kavanagh, 2007). Entscheidend für die transkriptionelle Aktivität der TCF/LEFs sind aber auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Sumoylierungen (Kikuchi et al., 2006).

B.3.5 Wnt-Zielgene

Wnt-Zielgene zeichnen sich durch eine oder mehrere TCF/LEF-Bindungsstellen in ihrer Promotor/Enhancer-Region aus, wobei entscheidend ist, dass diese zur Expression des entsprechenden Gens beitragen (Moon, 2011). Die meisten Zielgene weisen nur 1-2 solcher TCF/LEF-Bindungsstellen auf (Barolo, 2006). Jedoch scheint die Anwesenheit von TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen nicht allein für die Regulation von Wnt-Zielgenen verantwortlich zu sein. Vielmehr spielen auch der Differenzierungsstatus und der jeweilige Zelltyp eine tragende Rolle (Vlad et al., 2008). Außerdem sind die Art der Aktivierung und die Interferenzen mit dem Signalweg selbst von großer Bedeutung (Ziegler et al., 2005).

Zu den Wnt-Zielgenen zählt beispielsweise Cyclin D1, welches als Regulator des Zellzyklus proliferierender Zellen fungiert (Shtutman et al., 1999). Die Matrix-Metalloprotease MMP-7 und die MT1-MMP (*membrane type 1-MMP*), welche an invasiven Zellprozessen beteiligt sind, stellen ebenfalls Wnt-Zielgene dar (Brabletz et al., 1999; Takahashi et al., 2002).

Des Weiteren werden auch Gene, die Komponenten des Wnt-Signalweges darstellen, transkriptionell durch Wnt reguliert. Hierzu gehören beispielweise der Rezeptor Fzd7 (Willert et al., 2002), der negative Regulator Dkk-1 (Gonzalez-Sancho et al., 2005; Niida et al., 2004) und Axin2 (Jho et al., 2002; Leung et al., 2002; Lustig et al., 2002), aber auch einige TCF/LEF-Proteine selbst (Hovanes et al., 2001; Roose et al., 1999), wobei positive bzw. negative Feedback Loops generiert werden, die zur Feinsteuerung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beitragen können.

B.4 Wnt/ β -Catenin-Signalweg in adulten Stammzellen

Im Jahr 2003 konnte gezeigt werden, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg eine wichtige Funktion im Hinblick auf die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen übernimmt (Reya et al., 2003). Kurze Zeit später wurde auch in mesenchymalen Stammzellen die Rolle des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beschrieben. Zum einen wird die Proliferation der hMSC nach Stimulation des Signalweges mit Wnt-3a gefördert, wohingegen die Differenzierung inhibiert wird (Boland et al., 2004; De Boer et al., 2004b). Des Weiteren wurde gezeigt, dass für die endogene Wnt-Signaltransduktion in hMSC das Expressionsprofil von zahlreichen Wnts und anderen Komponenten des Signalweges entscheidend ist (Etheridge et al., 2004). In unserer Arbeitsgruppe konnte außerdem eine Beteiligung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges an der Regulation der Invasion von hMSC gezeigt werden (Neth et al., 2006; Neth et al., 2007).

C FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNG

In den vergangenen Jahren gab es eine Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen, die sich mit der detaillierten Aufklärung der Signaltransduktionsprozesse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges beschäftigten. Dabei wurden vor allem die intrazellulären Komponenten beschrieben und teilweise ihre Funktionen charakterisiert. Bezüglich der Initiation der Signalkaskade an der Zelloberfläche ist bislang jedoch nur äußerst wenig bekannt. Dies gilt insbesondere für die Beteiligung von Fzds und LRPs an der Signaltransduktion.

Für die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 existieren zwar Berichte, die die verschiedenen Phänotypen des jeweiligen Knockouts bzw. von unterschiedlichen Mutationen im Tiermodell und in Zelllinien beschreiben. Jedoch ist im Hinblick auf ihre genaue molekulare Funktion und mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten dabei nach wie vor nur sehr wenig bekannt.

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen sollte in dieser Arbeit die molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 hinsichtlich ihrer Rolle bei der Signaltransduktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von hMSC näher charakterisiert werden. Besonderes Interesse sollte der Aufklärung dienen, inwiefern LRP5 und LRP6 dabei redundante oder divergente Funktionen übernehmen bzw. ob sie sich aufgrund ihrer hohen Sequenz- und Strukturähnlichkeit möglicherweise gegenseitig ersetzen können.

Weiterführend sollte zudem untersucht werden, inwiefern LRP5 bzw. LRP6 auf die Differenzierungsfähigkeit von hMSC Einfluss nehmen.

Folgende Einzelziele sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

1. Etablierung des TCF/LEF-Reportergen-Systems in hMSC

Für Untersuchungen des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC sollte zunächst ein TCF/LEF-Reportergen-System entwickelt werden, das die eingehende Analyse β -Catenin-abhängiger Prozesse mit hoher Sensitivität und Spezifität erlaubt. Vor dem Hintergrund zelluläre Prozesse mit Beteiligung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auch über einen längeren Zeitraum untersuchen zu können, sollte dieses System auch stabil in hMSC eingebracht werden.

2. Vergleichende Analyse der molekularen Funktion von LRP5 und LRP6

Unter Einsatz dieses TCF/LEF-Reportergensystems sollten vergleichende Analysen von LRP5 und LRP6 bezüglich der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion durchgeführt werden, die neben RNA-Interferenz gegen die LRPs auch deren Überexpression sowie Rescue-Experimente umfassen sollte.

Des Weiteren sollte unter den gleichen experimentellen Bedingungen der jeweilige Effekt auf das Wnt-Zielgen Axin2 ermittelt werden.

Darüber hinaus sollten unter Verwendung des ϕ C31-Integrase-Systems stabil LRP-exprimierende hMSC-Populationen generiert werden, um langfristige Effekte einer stabilen Überexpression der LRPs näher untersuchen zu können.

3. Analyse der Differenzierungsfähigkeit von TCF/LEF-Reportergen-hMSC

TCF/LEF-Reportergen-hMSC sollten mit den entsprechenden Differenzierungsmedien in die adipogene und osteogene Richtung differenziert werden. Neben den charakteristischen Differenzierungsmarkern PPAR- γ und Decorin sollte auch der Einfluss auf die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion über die Gaussia Luciferase Reportergen-Aktivität untersucht werden.

4. Einfluss von LRP5 und LRP6 auf das Differenzierungsverhalten von hMSC

Zur Aufklärung eines möglichen Einflusses von LRP5 oder LRP6 auf die Differenzierung von hMSC sollten nach RNA-Interferenz sowohl morphologische Veränderungen der hMSC als auch die damit einhergehenden Veränderungen entsprechender Marker bzw. Transkriptionsfaktoren ermittelt werden.

Des Weiteren sollten die entsprechenden Untersuchungen nach RNA-Interferenz in Kombination mit chemischer Induktion der Differenzierung durchgeführt werden. Dabei sollten zelluläre Veränderungen mittels spezifischer Färbung charakteristischer Strukturen sowie durch qRT-PCR-Analysen analysiert werden.

D MATERIAL UND METHODEN

D.1 Material

D.1.1 Chemikalien und Material

Alle Chemikalien wurden in der Reinheitsstufe *pro analysis* eingesetzt. Die verwendeten Reaktionsgefäße unterschiedlicher Größe, die Glaspasteurpipetten, die verschiedenen Kultivierungsgefäße aus Glas und die Medien für die Mikrobiologie wurden vor der Verwendung bei 121 °C mit einem Überdruck von 1×10^5 Pa für 20 Minuten autoklaviert. Alle anderen Materialien wurden steril bezogen.

Für molekularbiologische Ansätze wurde „*Aqua ad injectabilia*“ der Fa. AlleMan Pharma GmbH (Rimbach) verwendet.

Zur Herstellung wässriger Lösungen kam deionisiertes Wasser (dH₂O) zum Einsatz, welches durch das Reinstwassersystem der Fa. SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH (Haimhausen) erhalten wurde.

D.1.1.1 Chemikalien und Material für die Mikrobiologie

D.1.1.1.1 Bakterienstämme

Für die Transformation von Plasmiden wurden die nachfolgenden *E. coli*-Stämme verwendet. Des Weiteren dienen diese Bakterienstämme zum Aufbau der Stammsammlung.

OneShot® TOP10 chemisch kompetente *E. coli* (Invitrogen; Karlsruhe)

Genotyp: F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ-

ER2925 chemisch kompetente *E. coli*

Diese chemisch kompetenten Zellen wurden aus dem Stamm *E. coli* K12 ER2925 (New England Biolabs; Frankfurt am Main) selbst hergestellt.

Genotyp: ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2

D.1.1.1.2 Chemische Substanzen

Ampicillin Natrium-Salz	Carl Roth; Karlsruhe
Bacto Agar	BD Biosciences; Heidelberg
Bacto Hefeextrakt	BD Biosciences; Heidelberg
Bacto Trypton (Casein-Peptone, tryptisch verdaut)	BD Biosciences; Heidelberg
Calciumchlorid	Carl Roth; Karlsruhe
D(+)-Glucose Monohydrat	Merck; Darmstadt

Glycerin	Carl Roth; Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth; Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth; Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth; Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth; Karlsruhe

D.1.1.1.3 Material

Erlenmeyerkolben 50 ml, 250 ml	Wagner & Munz; München
Impföse	Carl Roth; Karlsruhe
Kapsenberg-Röhrchen	Wagner & Munz; München
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc; Wiesbaden
Petrischalen, Polystyrol ø 9 cm	Greiner Bio-One; Frickenhausen

D.1.1.1.4 Kulturmedien

• DYT-Medium	5 g/l NaCl 10 g/l Hefeextrakt 16 g/l Trypton
• S.O.C.-Medium	5 g/l NaCl 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Trypton 1,2 g/l MgSO ₄ 0,95 g/l MgCl ₂ 20 g/l D(+)-Glucose, steril filtriert

Für die Herstellung von DYT-Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 16 g/l Agar zugesetzt. Die Zugabe der hitzelabilen Antibiotika-Lösung erfolgte nach Abkühlen auf 50 °C.

D.1.1.2 Chemikalien und Material für die Molekularbiologie

D.1.1.2.1 Chemische Substanzen

β-Mercaptoethanol	Carl Roth; Karlsruhe
Biozym LE Agarose	Biozym; Hessisch Oldendorf
DNA-Auftragspuffer, 6x	Fermentas; St. Leon-Rot
DNA-Molekulargewichtsmarker:	
Generuler 1kb	Fermentas; St. Leon-Rot
Ultra Low Range	Peqlab Biotechnology; Erlangen
dNTP-Mischung, je 10 mM	New England Biolabs; Frankfurt am Main
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth; Karlsruhe
Eisessig	Merck; Darmstadt
Ethanol	Merck; Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Isopropanol	Merck; Darmstadt

D.1.1.2.2 Enzyme

Antarktische Phosphatase	New England Biolabs; Frankfurt am Main
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs; Frankfurt am Main
Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs; Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen Typ II	New England Biolabs; Frankfurt am Main
Taq DNA-Polymerase	Qiagen; Hilden
T4 DNA-Ligase	Roche; Mannheim
T4 Polynukleotid Kinase	Qiagen; Hilden

D.1.1.2.3 Kits

HiSpeed Midi	Qiagen; Hilden
LightCycler® FastStart SYBR Green I	Roche; Mannheim
MinElute® Gel Extraction	Qiagen; Hilden
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnology; Erlangen
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen; Hilden
Rneasy Mini + QIAshredder	Qiagen; Hilden
TOPO® TA Cloning® Kit, pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen; Karlsruhe

D.1.1.2.4 Material

Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Corning Costar; New York, USA
Filter-Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Kisker; Steinfurt
LightCycler® Kapillaren	Roche; Mannheim
PCR Gefäße 0,2 ml	Eppendorf; Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt; Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf; Hamburg

D.1.1.2.5 Oligonukleotide für Plasmidkonstruktionen

Die Oligonukleotide wurden von der Fa. Metabion (Martinsried) mit den Überhängen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen (RE) (*Sac*II bei LRP5; *Bsr*GI bei LRP6) für die direkte Ligation in die Zielvektoren synthetisiert.

Oligonukleotide für den N-terminalen Flag-tag in LRP5 (5'→3')

Top	GGCCTCGCCGACCGGTGATTACAAGGATGACGACGATAAGACTAGTCCCGC
Bottom	GGGACTAGTCTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCACCGGTGCGGAGGCCGC

Oligonukleotide für den C-terminalen HA-tag in LRP6 (5'→3')

Top	GTACAACCGGTATGTATCCGTACGATGTACCAGACTATGCGGGTACCTTCGAAT
Bottom	GTACATTCTGAAGGTACCCGCATAGTCTGGTACATCGTACGGATACATACCGGTT

D.1.1.2.6 PCR-Primer

Tab. D-1: Primer zur Amplifikation der LRP6 cDNA.

Fragment (CDS- Region)	Primer	Primer Sequenz 5'→3'	5'-Restriktions- schnittstelle
LRP6 F1 (1-1847)	forward	CGCGGATCCATGGGGGCCGTCCTGAG	<i>Bam</i> HI
	reverse	CGGTTAAGCCAATAGGGCAAGCACAGCGAAGG	<i>Bgl</i> II
LRP6 F2 (1848- 3698)	forward	CGTTAAGCCCTATTGGCTTTGAACTCATCAG	<i>Bgl</i> II
	reverse	CGTTAAACCAGGTGCATGGGGCAAG	<i>Sex</i> AI
LRP6 F3 (3699- 4842)	forward	GCGCGTTAAACCTGGTTCTACTTCAAGATGAGC TATCATGTG	<i>Sex</i> AI
	reverse	CGTTAAGGGCCCTCTAGATGGTCTGCCTCATCCTTC	<i>Apa</i> I

D.1.1.2.7 Pufferlösung für die Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE	242 g/l TRIS-Base 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 57,1 ml Eisessig ad 1 l dH ₂ O
---------	--

Zur Herstellung von 1x TAE wurden 20 ml 50x TAE mit 980 ml Wasser verdünnt.

D.1.1.3 Chemikalien und Material für die Proteinbiochemie

D.1.1.3.1 Antikörper

Primäre Antikörper

<i>goat</i> anti-LRP5 (Y-20)	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
<i>mouse</i> anti-GAPDH (6C5), monoklonal	Calbiochem/Merck; Darmstadt
<i>mouse</i> anti-LRP6 (C-10)	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
<i>rabbit</i> anti-APC (C-20)	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
<i>rabbit</i> anti-β-Catenin (6B3), monoklonal	Cell Signaling; USA
<i>rabbit</i> anti-Flag® M2 Antibody (HRP-Konjugat)	Cell Signaling; USA
<i>rabbit</i> anti-LRP5 (D23F7), monoklonal	Cell Signaling; USA
<i>rat</i> anti-HA-Peroxidase <i>High Affinity</i> (clone 3F10)	Roche; Mannheim

Sekundäre Antikörper

<i>donkey</i> anti-goat IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
<i>donkey</i> anti-rabbit IgG ECL, HRP-konjugiert	GE Healthcare; Freiburg
<i>goat</i> anti-mouse IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg
<i>goat</i> anti-rat IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg

D.1.1.3.2 Chemische Substanzen

Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth; Karlsruhe
Bromphenolblau, Na-Salz	Serva; Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth; Karlsruhe
Dithiothreitol	Carl Roth; Karlsruhe
EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem/Merck; Darmstadt
Glycerin	Carl Roth; Karlsruhe
Glycin	Carl Roth; Karlsruhe
Iodacetamid	Carl Roth; Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth; Karlsruhe
Kodak GBX Entwickler	Kodak; Stuttgart
Kodak GBX Fixierer	Kodak; Stuttgart
Magermilchpulver, Blotting grade	Carl Roth; Karlsruhe
Methanol	Merck; Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth; Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth; Karlsruhe
Natronlauge 1 N	Carl Roth; Karlsruhe
NP-40	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
PBS, 1x	PAA; Österreich
Protein Kaleidoskop Standard	BioRad; München
Rotiphorese® Gel 40 (37,5 : 1)	Carl Roth; Karlsruhe
Rotistock 20 % SDS	Carl Roth; Karlsruhe
Salzsäure rauchend, 37 %	Merck; Darmstadt
TEMED	Carl Roth; Karlsruhe
TRIS-Base	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Triton X-100	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Tween® 20	Sigma-Aldrich; Deisenhofen

D.1.1.3.3 Kits

Gaussia-Juice	PJK GmbH; Kleinblittersdorf
Western-Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer; Rodgau

D.1.1.3.4 Material

Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare; Freiburg
Hypercassette™	Amersham Biosciences Europe; Freiburg
Nitrocellulosemembran BA85, 0,45 µM	Schleicher & Schuell; Kassel
Whatman Filterpapier; Grade 3MM	Whatman; Dassel
96-Loch Mikrotiterplatte, schwarz	Corning Costar; USA

D.1.1.3.5 Pufferlösungen

- Cytosolischer Lysepuffer:
 - 50 mM Na_2HPO_4
 - 50 mM NaH_2PO_4
 - 0,2 M NaCl
 - 5 mM EDTA, pH 8,0
 - 1 % Triton X-100
- Lysepuffer nach Leeb-Lundberg:
 - 10 mM TRIS-HCl, pH 7,4
 - 150 mM NaCl
 - 25 mM KCl
 - 0,1 % Triton X-100
- Lysepuffer nach Maquoi:
 - 50 mM TRIS-Base, pH 7,4
 - 150 mM NaCl
 - 1 % NP-40
 - 1 % Triton X-100
 - 0,1 % SDS
 - 5 mM Iodacetamid

Unmittelbar vor der Lyse der Zellen wurde die entsprechende Menge Lysepuffer mit 1:500 EDTA-freiem Protease Inhibitor Cocktail Set III versetzt.

- 5x Lämmli-Auftragspuffer:
 - 0,25 M TRIS-HCl, pH 6,8
 - 0,35 M SDS
 - 50 % Glycerol
 - 0,5 M DTT
 - 1,45 mM Bromphenolblau, Na-Salz
- 10x SDS-Laufpuffer
 - 30,3 g/l TRIS-Base, pH 8,3
 - 144,5 g/l Glycin
 - 50 ml SDS 20 %
 - ad 1 l dH_2O
- 10x Transferpuffer
 - 30,3 g/l TRIS-Base, pH 8,3
 - 144,5 g/l Glycin
 - 50 ml SDS 20 %
 - ad 1 l dH_2O

Zur Herstellung des 1x SDS-Laufpuffers wurde der 10x Puffer 1:10 mit Wasser verdünnt. Für die Generierung des 1x Transferpuffers wurden 100 ml 10x Puffer mit 700 ml Wasser und 200 ml Methanol versetzt. Die 10x Puffer wurden bei Raumtemperatur gelagert, wohingegen die 1x Puffer bei 4 °C aufbewahrt wurden.

- 10x TBS
 - 24,2 g/l TRIS-Base
 - 80 g/l NaCl

Um 1x TBS-T zu erhalten, wurde das 10x TBS 1:10 mit Wasser verdünnt und mit 0,1 % Tween® 20 versehen.

D.1.1.4 Chemikalien und Material für die Zellbiologie

D.1.1.4.1 Chemische Substanzen

α-Ascorbinsäure-Phosphat	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
β-Glycerol-Phosphat	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Dexamethason	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Carl Roth; Karlsruhe
Ethanol	Merck; Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Geneticin (G418)	PAA; Österreich
Indomethacin	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Insulin, human 3,5 mg/ml	BioCat GmbH; Heidelberg
Isopropanol	Merck; Darmstadt
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Lipofectamine 2000	Invitrogen; Karlsruhe
Lithiumchlorid, 8 M	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
Oil Red O	Sigma-Aldrich; Deisenhofen
PBS, 1x	PAA; Österreich
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml	PAA; Österreich
Poly-D-Lysin, 1 mg/ml	Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.
Rotistock 20 % SDS	Carl Roth; Karlsruhe
Trypsin/EDTA, 10x	PAA; Österreich

D.1.1.4.2 Material

Einfrierbox	Nunc; Wiesbaden
Falconröhrchen 15 ml, 50 ml	Corning Costar; USA
Filter-Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Kisker; Steinfurt
Glaspasteurpipetten	Brand; Wertheim
Polystyrol-Röhrchen 5 ml, 14 ml	BD Falcon; Heidelberg
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Costar; USA
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Corning Costar; USA
Zellkulturplatten mit 6/12/24 Kavitäten	Corning Costar; USA
Zellkultur Petrischalen, ø 10 cm	Nunc; Wiesbaden

D.1.1.4.3 Medien

DMEM High Glucose	PAA; Österreich
MEM α-modifiziert (α-MEM)	PAA; Österreich
Einfriermedium	65 % Medium (α-MEM oder DMEM) 30 % FBS 5 % DMSO

Zur Kultivierung der hMSC wurde das α -MEM mit 16,5 % hitzeinaktiviertem FBS und 100 U/ml Pen/Strep versetzt. War eine Selektion der hMSC gewünscht, so wurde dem Medium zusätzlich Geneticin mit einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugegeben.

Für die Kultur von HEK-293 wurde DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS und 100 U/ml Pen/Strep verwendet.

D.1.1.4.4 Rekombinantes Protein

humanes Wnt-3a

R&D Systems; USA

D.1.1.4.5 siRNAs

Die siRNA-Sequenzen wurden anhand beschriebener Kriterien (Reynolds et al., 2004) ausgewählt und von der Fa. Qiagen (Hilden) synthetisiert. In Tab. D-2 sind die entsprechenden Sequenzen dargestellt.

Tab. D-2: Übersicht über die verwendeten siRNA-Sequenzen.

siRNA	NCBI Referenz-Sequenz	Ziel-Sequenz
		Sense-Sequenz Antisense-Sequenz
Negativ Kontrolle (nc)	-	5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3' 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3' 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAAdTdT-3'
APC	NM_000038.5	5'-AATGAGAGCACTGATGATAAA-3' 5'-r(UGAGAGCACUGAUGAUAAA)dTdT-3' 5'-r(UUUAUCAUCAGUGCUCUCA)dTdT-3'
β -Catenin	NM_001904.3	5'-AATGGTTGCCTTGCTCAACAA-3' 5'-UGGUUGCCUUGCUCACAATT-3' 5'-UUGUUGAGCAAGGCAACCATT-3'
LRP5	NM_002335.2	5'-AACCAACGACCTCACCATTGA-3' 5'-CCAACGACCUCACCAUUGATT-3' 5'-UCA AUGGUGAGGUCGUUGGTT-3'
LRP6 #2	NM_002336.2	5'-AAGCTCAACCGTGAAGTTATA-3' 5'-GCUCAACCGUGAAGUUUAUATT-3' 5'-UAUAACUUCACGGUUGAGCTT-3'
LRP6 #3	NM_002336.2	5'-AACATTGAGCGTGCCAACAAA-3' 5'-CAUUGAGCGUGCCAACAATT-3' 5'-UUUGUUGGCACGCUCAAUGTT-3'
LRP6-3'-UTR #2	NM_002336.2	5'-AAGCAACTGAGTACAAAGGAA-3' 5'-GCAACUGAGUACAAAGGAATT-3' 5'-UUCCUUUGUACUCAGUUGCTT-3'

D.1.1.4.6 Zellen

Humane mesenchymale Stammzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten hMSC wurden vom Labor von Herrn Prof. Darwin Prockop (Tulane University; New Orleans, USA) in kryokonservierter Form bezogen. Zu deren Isolierung wurden Knochenmarkbiopsien des oberen Beckenkamms erwachsener Spender herangezogen. Die Stammzellen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation und nachfolgend mit ihrer selektiven Adhärenz an Plastik über mehrere Tage angereichert (Sekiya et al., 2002). In diesem Fall handelt es sich um die Zellen von einem männlichen Spender im Alter von 27 Jahren, die in der ersten Passage eingefroren wurden. Sie wurden im Labor von Prof. Prockop hinsichtlich verschiedener Merkmale untersucht. Die Zellen wurden in die adipogene, chondrogene und osteogene Richtung differenziert. Des Weiteren wurde ihre Fähigkeit zur Koloniebildung analysiert. Eine durchflusszytometrische Analyse ergab eine positive Expression der Oberflächenmarker CD44, CD166, CD90, CD105, CD147, CD49c, CD49f, CD29 und CD59, wohingegen für CD36, CD34, CD117 und CD45 keine Expression nachgewiesen werden konnte.

TCF/LEF-Reportergen-hMSC

Für den Nachweis β -Catenin-abhängiger Expressionen mit Hilfe der transkriptionell aktiven β -Catenin Fraktion wurden sogenannte TCF/LEF-Reportergen-hMSC generiert. Dazu wurden die unmodifizierten hMSC stabil mit dem TCF/LEF-Reportergen-Plasmid pN3-Bar-Gluc transfiziert.

Als korrespondierende Kontrolle wurden hMSC mit dem Plasmid pN3-fuBar-Gluc transfiziert, in dem die TCF/LEF-Bindestellen mutiert sind. Die entsprechenden hMSC-Populationen wurden als fuBar-Reporter-hMSC bezeichnet.

HEK-293

HEK-293 Zellen (Flp-In™ T-Rex™ 293; Invitrogen; Karlsruhe) wurden freundlicherweise von der Herrn PD Dr. Alexander Faußner (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) zur Verfügung gestellt.

D.1.2 Datenbanken

ExPASy	www.expasy.org
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
SignalP	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
UniProt	www.uniprot.org

D.1.3 Geräte

Autoklav 3850L	Systemec GmbH; Wettenberg
Biophotometer	Eppendorf; Hamburg
CO ₂ -Inkubator Galaxy S	RS Biotech; England
DigiScan 400 (ELISA-Reader)	ASYS Hitech GmbH; Österreich
Eismaschine AF100	Scotsman; Italien
Gel-Dokumentationssystem mit UV-Tisch	Intas; Göttingen

Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf; Hamburg
Horizontale Gelelektrophorese- Apparaturen	Peqlab Biotechnology; Erlangen
Kühlschrank Typ BBC FL350, +4 °C	AGS; Heidelberg
Laborkühlschrank LabStar Triton, +4 °C	Siemens; München
LightCycler® 1.5-System	National Lab GmbH; Mölln
LightCycler® Centrifuge Adaptors	Roche; Mannheim
Magnetrührer IKA-Combimag Typ RKO	Roche; Mannheim
Mehrkanalpipette (20-200 µl)	Jahnke & Kunkel GmbH; Staufen
Mikroskope:	Gilson; Limburg
IX50 mit UV-Lampe U-RFL-T	Olympus; Feldkirchen-Westerham
IX70 mit	Olympus; Feldkirchen-Westerham
POC Chamber	PeCon; Erbach
Tempcontrol 32-2	PeCon; Erbach
SensiCam QE	PCO CCD Imaging; Kehlheim
UV-Lampe BH2-RFL-T3	Olympus; Feldkirchen-Westerham
Mikrowelle R-6200	Sharp; Japan
NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnology; Erlangen
Neubauer Zählkammer	Plazotta; München
Orbitalschüttler Certomat R	Braun Biotech International; Melsungen
PCR-Geräte:	
PCR Mastercycler Gradient	Eppendorf; Hamburg
PCR Thermal Cycler Gene Amp 2400	PerkinElmer; Rodgau
pH-Meter Typ 526 mit pH-Elektrode	WTW; Weilheim
Pipettensatz	Gilson; Limburg
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt
Reinstwassersystem Clear, Clear-UV plus	SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH; Haimhausen
Scanner GS-800	BioRad; München
Sicherheitswerkbänke:	
BDK 7419, Modell UVF 6.18S	BDK; Sonnenbühl-Genkingen
Herasafe Typ HS12	Heraeus Instruments; Göttingen
Spannungsquellen	
Consort EV 243	Peqlab Biotechnology; Erlangen
PHEO-stab. 500	Bachofer; Reutlingen
Spectrofluorimeter Safire2	Tecan; Crailsheim
Thermal printer DPU-414	Seiko Instruments; Neu Isenburg
Tiefkühlgefrierschränke	
Colora UF 85-300S, -80 °C	Colora; Lorch
Liebherr Premium Frost, -20 °C	Liebherr; Biberach
Stickstofftank Locator4	Sigma-Aldrich; Taufkirchen
Vortex Genie 2™	Bendorf Hobein AG; Zürich, Schweiz

Waagen

Analysenwaage, A 120 S (0,001-12 g)	Sartorius; Göttingen
Technische Waage, 3716MP (0,001-250 g)	Sartorius; Göttingen

Wasserbäder

Exatherm U3 electronic	Julabo; Seelbach
Typ WB-14	Memmert; Schwabach

Wärmeschränke

Typ B30	Memmert; Schwabach
Typ BE30	Memmert; Schwabach

Western Blot Apparatur:

Mini PROTEAN® Electrophoresis Cell	BioRad; München
Mini Transblot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad; München

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge Eppendorf 5415R	Eppendorf; Hamburg
Kühlzentrifuge Universal 32R	Hettich; Tuttlingen
Minizentrifuge	Wagner & Munz; München
Tischzentrifuge Eppendorf 5415D	Eppendorf; Hamburg
Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech; München

D.1.4 Software

CorelDRAW Graphic Suite X4	Corel Korporation; Kanada
LightCycler® Software 3.5	Roche; Mannheim
Microsoft Office 2007	Microsoft; Unterschleißheim
MikroWin 2000	Mikrotek Laborsysteme GmbH; Overath
Quantity One	BioRad; München
SECentral Version 9	SciEdSoftware; USA
SigmaPlot 10.0	Systat Software Inc.; USA
Xfluor4 Safire2	Tecan; Crailsheim

D.1.5 Vektoren

D.1.5.1 Klonierungsvektoren

pCR®2.1-TOPO®-Vektor (Invitrogen; Karlsruhe)

Für die Sequenzierung von cDNA (*complementary DNA*)-Fragmenten mit 3'-überhängenden Desoxyadenosin-Molekülen, welche für die Herstellung von Expressionsvektoren nötig waren, wurden diese in den Vektor pCR®2.1-TOPO® der Fa. Invitrogen kloniert (Abb. D-1). Der Vektor liegt in linearer Form mit je einem 5'-überhängenden Desoxythymidin-Molekül und einer an dessen 3'-Phosphatgruppe kovalent gekoppelten Topoisomerase I vor. Die kompatiblen Enden des PCR-Produktes und des Vektors können somit effizient durch die Topoisomerase miteinander ligiert werden. Mit Hilfe

der Antibiotika-Resistenzgene Ampicillin und Kanamycin können die damit transformierten *E. coli* selektioniert werden.

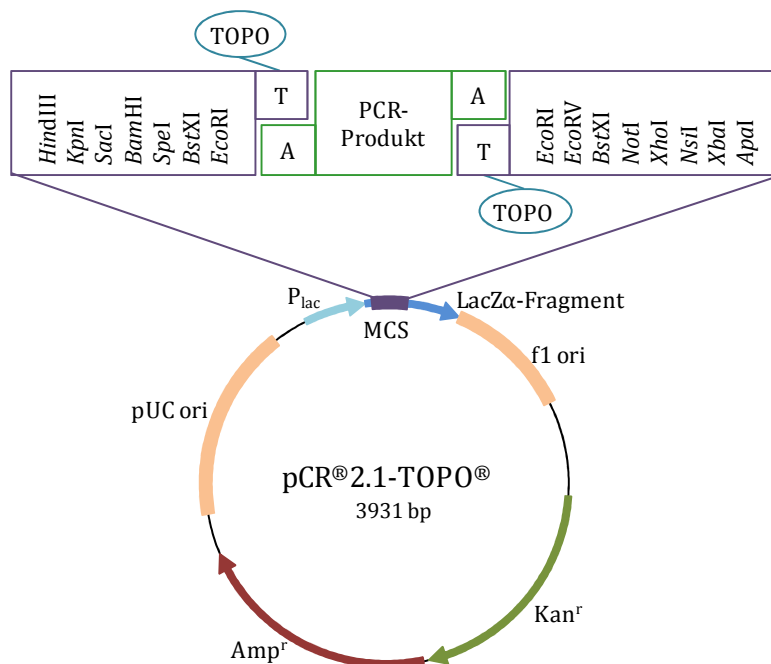


Abb. D-1: Plasmidkarte des Klonierungsvektors pCR®2.1-TOPO®.

P_{lac}: Promotor des lac-Operon; MCS: multiple Klonierungsstelle; LacZα-Fragment: Fragment des β-Galactosidase Reportergens; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; Kan^r: Kanamycin-Resistenzgen; Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

pMK-RQ-LRP5-2xFlag

Für die Insertion des 2xFlag-tags am C-Terminus der CDS von LRP5 wurde ein synthetisches, 407 bp umfassendes Genfragment von der Fa. GeneArt (Regensburg) im Klonierungsvektor pMK-RQ (Abb. D-2) generiert, welches die zur Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen trägt.

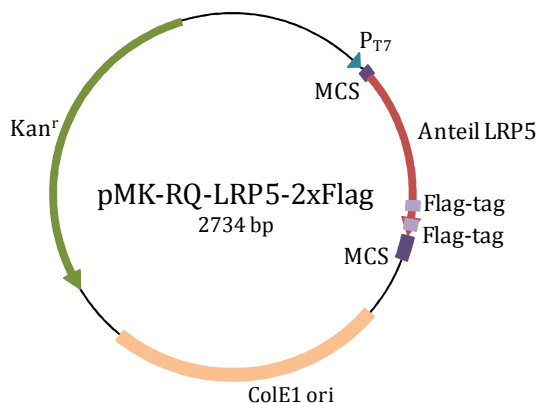


Abb. D-2: Plasmidkarte des Klonierungsvektors pMK-RQ-LRP5-2xFlag.

P_{T7}: Promotor des Phagen T7; MCS: multiple Klonierungsstelle; Anteil LRP5: C-terminaler Anteil der CDS von LRP5; Flag-tag: Flag-tag Sequenz; Cole1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; Kan^r: Kanamycin-Resistenzgen.

pMA-HA-LRP6

Zur Einführung eines N-terminalen HA (Hämagglutinin)-tag in die CDS von LRP6 wurde ebenfalls ein synthetisches Konstrukt (197 bp) von der Fa. GeneArt im Klonierungsvektor pMA bezogen (Abb. D-3), welches mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehen ist.

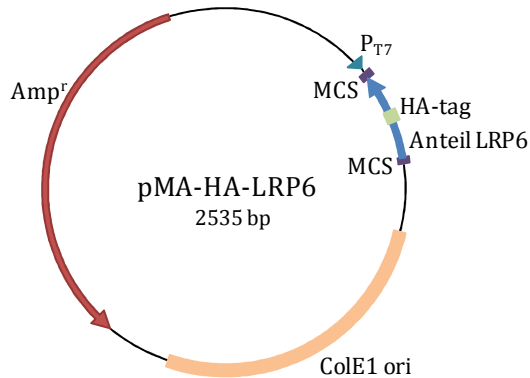


Abb. D-3: Plasmidkarte des Klonierungsvektors pMA-HA-LRP6.

P_{T7}: Promotor des Phagen T7; MCS: multiple Klonierungsstelle; HA-tag: HA-tag Sequenz; Anteil LRP6: N-terminaler Anteil der CDS von LRP6; ColE1 ori: Plasmid-Replikationsursprung; Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen.

D.1.5.2 Überexpressionsvektoren

pN3-Mock

Zur Klonierung von Expressionsvektoren für den Einsatz in der Zellkultur wurde der Leervektor pN3-Mock (Abb. D-4) verwendet. Das Rückgrat enthält eine ausgeprägte multiple Klonierungsstelle (MCS), die das Einbringen des gewünschten Gens erlaubt. Des Weiteren verfügt der Vektor über den stark konstitutiven Promotor des Cytomegalievirus, der die Expression des eingebrachten Gens steuert. Über das Neomycin-Resistenzgen ist eine Selektion stabil transfizierter eukaryotischer Zellen möglich.

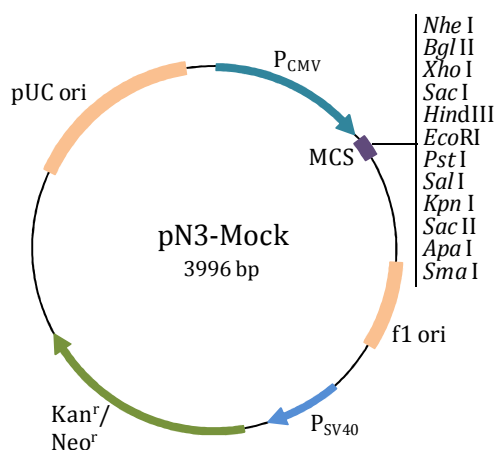


Abb. D-4: Plasmidkarte des Vektors pN3-Mock.

P_{CMV}: früher Promotor des humanen Cytomegalievirus; MCS: multiple Klonierungsstelle; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neor^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

pN3-LRP5

Das Plasmid pN3-LRP5 (Abb. D-5) enthält die kodierende Sequenz von LRP5 und wurde von Frau Dr. Marisa Karow hergestellt. Es dient zur ektopischen Expression von LRP5 in eukaryotischen Zellen. Des Weiteren wurde es als Ausgangsplasmid für die Klonierung der getaggtten Varianten eingesetzt.

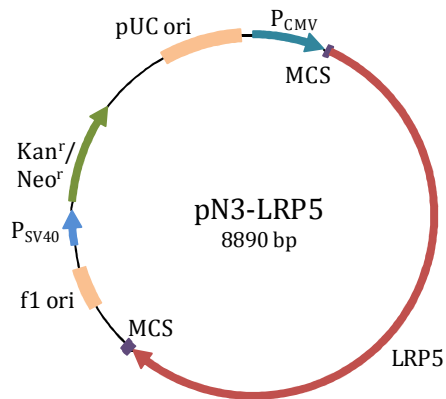


Abb. D-5: Plasmidkarte des Expressionsvektors pN3-LRP5.

P_{CMV}: früher Promotor des humanen Cytomegalievirus; MCS: multiple Klonierungsstelle; LRP5: CDS von LRP5; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

pN3-Bar-Gluc

Das Plasmid pN3-Bar-Gluc (Abb. D-6) (generiert in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Peter Neth) stellt ein sogenanntes TCF/LEF-Reporter-Plasmid dar, welches eingesetzt wird, um β -Catenin-abhängige Expressionen transfizierter Zellen nachzuweisen. Als Reporterprotein dient die Gaussia Luciferase aus dem Tiefsee-Cephalopoden *Gaussia princeps* (Tannous et al., 2005; Verhaegent and Christopoulos, 2002), welche ein Signalpeptid trägt und somit in den Zellkulturüberstand sezerniert wird. Diese Luciferase katalysiert in Abwesenheit von ATP die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid. Dabei findet eine Lichtemission statt, die mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert werden kann. In diesem Reporter-System wird die Gaussia Luciferase nur nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern und Assoziation mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren exprimiert. Die Expression der Luciferase unterliegt dabei einem minimalem Promotor (P_{Min}). Unmittelbar vor der Promotor-Sequenz befindet sich das Bar-Element (*β -Catenin activated reporter*) aus 12 aufeinander folgenden TCF/LEF-Bindungsstellen (AGATCAAAGG), die jeweils durch verschiedene Spacer-Sequenzen, bestehend aus 5 Basen, getrennt sind. Die Sequenz der TCF/LEF-Bindungsstellen enthält die höchst-affine *in vitro* Bindestelle ATCAAAGG (van Beest et al., 2000). Das Rückgrat besteht aus dem Vektor pN3-Mock, dessen CMV-Promotor durch den minimalen Promotor ausgetauscht wurde.

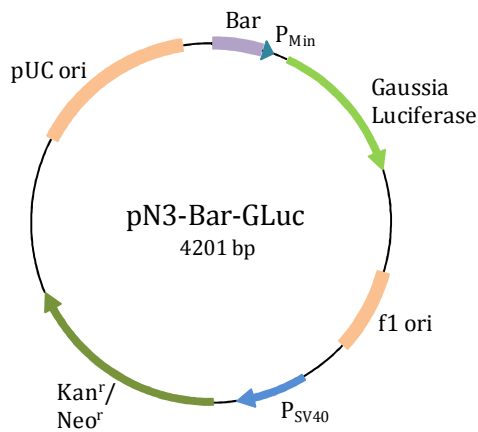


Abb. D-6: Plasmidkarte des TCF/LEF-Reportergen-Vektors pN3-Bar-Gluc.

Bar: β -catenin activated reporter Element mit 12 TCF/LEF-Bindungsstellen; P_{Min}: minimaler Promotor; Gaussia Luciferase: CDS der Gaussia Luciferase; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

pN3-fuBar-Gluc

Die korrespondierende Kontrolle zu dem Reportergen-Vektor pN3-Bar-Gluc stellt das Plasmid pN3-fuBar-Gluc dar (Abb. D-7) (generiert in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Peter Neth). Das Vektorrückgrat ist aus den gleichen Elementen wie der Reportergen-Vektor aufgebaut, wobei jedoch die ursprünglichen 12 TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen durch 12 entsprechend mutierte TCF/LEF-Bindungsstellen (AGGCCAAAGG), fuBar (*found unresponsive Bar*) genannt, ersetzt wurden.

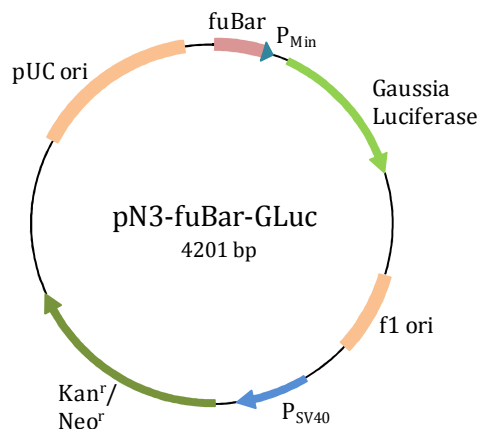


Abb. D-7: Plasmidkarte des mutierten TCF/LEF-Reportergen-Vektors pN3-fuBar-Gluc.

fuBar: found unresponsive β -catenin activated reporter Element mit 12 mutierten TCF/LEF-Bindungsstellen; P_{Min}: minimaler Promotor; Gaussia Luciferase: CDS der Gaussia Luciferase; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

pTOP-Gluc

Der Vektor pTOP-Gluc (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Randall T. Moon; University of Washington; Seattle, USA) ist ein weiteres TCF/LEF-Reportergen-Plasmid. Wie das Plasmid pN3-Bar-Gluc trägt es als Reportergen die

Gaussia Luciferase unter Kontrolle eines minimalen Promotors. Im Gegensatz zu pN3-Bar-Gluc trägt es jedoch nur 8 aufeinander folgende TCF/LEF-Bindungsstellen (TOP), welche immer durch die gleiche, 5 bp umfassende Spacer-Sequenz voneinander getrennt sind.

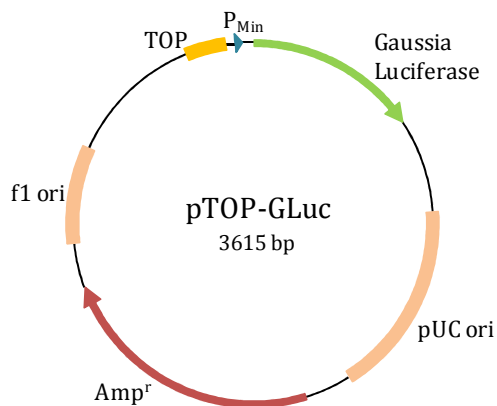


Abb. D-8: Plasmidkarte des TCF/LEF-Reportergen-Vektors pTOP-Gluc.

TOP: 8 TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen; P_{Min}: minimaler Promotor; Gaussia Luciferase: CDS der Gaussia Luciferase; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung; Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung.

pFOP-Gluc

Als Kontrolle für pTOP-Gluc dient der Vektor pFOP-Gluc, der ebenfalls von Herrn Prof. Randall T. Moon bereit gestellt wurde. Das Rückgrat des Vektors ist analog zu pTOP-Gluc aufgebaut, wobei es aber 8 mutierte TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen (FOP) trägt.

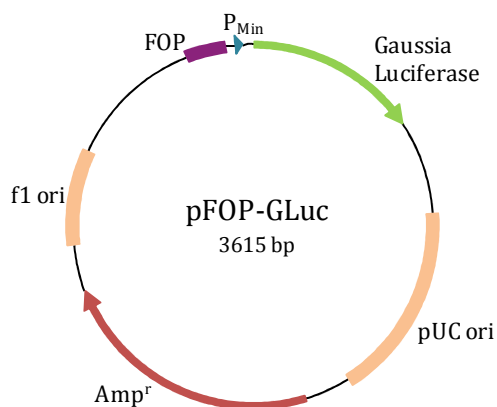


Abb. D-9: Plasmidkarte des mutierten TCF/LEF-Reportergen-Vektors pFOP-Gluc.

FOP: 8 mutierte TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen; P_{Min}: minimaler Promotor; Gaussia Luciferase: CDS der Gaussia Luciferase; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung; Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung.

pCMVInt

Der Vektor pCMVInt (Abb. D-10) wurde freundlicherweise von Frau Prof. Michele Calos (Stanford University; Stanford, USA) zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid erlaubt die Expression der Φ C31-Integrase des gleichnamigen Bakteriophagen für die ortsgerichtete Integration entsprechender Vektoren in genomische DNA (gDNA). Die Expression der Integrase unterliegt dem CMV-Promotor. Zur Selektion in Bakterien enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen. Der Vektor pCMVInt (Abb. D-10) wurde freundlicherweise von Frau Prof. Michele Calos (Stanford University; Stanford, USA) zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid erlaubt die Expression der Φ C31-Integrase des gleichnamigen Bakteriophagen für die ortsgerichtete Integration entsprechender Vektoren in genomische DNA (gDNA). Die Expression der Integrase unterliegt dem CMV-Promotor. Zur Selektion in Bakterien enthält der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen.

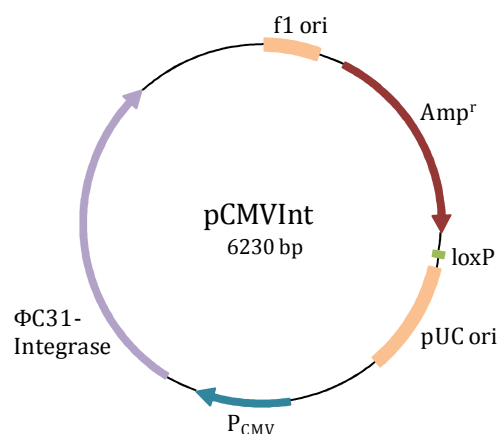


Abb. D-10: Plasmidkarte des Expressionsvektors pCMVInt.

F1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; loxP: loxP Rekombinationsstelle des Bakteriophagen P1; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung; P_{CMV}: früher Promotor des humanen Cytomegalievirus; Φ C31-Integrase: kodierende Sequenz für die Integrase des Bakteriophagen Φ C31.

Alle weiteren in der Zellkultur zur Überexpression eingesetzten Vektoren sind in Tab. D-3 zusammenfassend aufgelistet. Bei dem Vektorrückgrat handelt es sich dabei immer um pN3-Mock.

Die getaggten Varianten von LRP5 und LRP6 wurden für eine ortsspezifische Integration mittels Φ C31-Integrase außerdem in den entsprechenden Kontroll-Vektor pN3-attB-Mock eingebracht, der durch Exzision der CDS von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) aus dem Vektor pEGFP-N3-attB generiert wurde (siehe Abb. E-25).

Tab. D-3: Überexpressionsvektoren.

Vektor	Genprodukt
pN3-Mock (Kontrolle)	-
pN3-LRP5	LRP5
pN3-2xFlag-LRP5	N-terminal 2xFlag-getaggtetes LRP5
pN3-LRP5-2xFlag	C-terminal 2xFlag-getaggtetes LRP5
pN3-LRP6	LRP6
pN3-HA-LRP6	N-terminal HA-getaggtetes LRP6
pN3-LRP6-HA	C-terminal HA-getaggtetes LRP6

D.2 Methoden

D.2.1 Mikrobiologie

D.2.1.1 *Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Stämme*

Die entsprechenden *E. coli*-Stämme wurden mit einem 3-Ösenausstrich auf Agarplatten ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von einer Einzelkolonie ausgehend wurde eine 50 ml Vorkultur in DYT-Medium angeimpft und bei 37 °C über Nacht mit 200 Upm geschüttelt. Nach Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wurde diese Vorkultur in 250 ml vorgewärmtem DYT-Medium auf eine OD_{600} von 0,06-0,07 verdünnt und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,2 bei 200 Upm geschüttelt, wobei die OD_{600} alle 30 Minuten bestimmt wurde. Bei Erreichen dieser OD_{600} wurden der Kultur 75 ml vorgewärmtes DYT-Medium zugesetzt und diese für weitere 30 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Kultur in eiskalte 50 ml Falconröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 4 °C und 4.000 Upm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde mit 87,5 ml eiskaltem $MgCl_2$ (100 mM) resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation unter den obigen Bedingungen wurde das Sediment in 17,5 ml eiskaltem $CaCl_2$ (100 mM) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend wurde das Sediment nach einer letzten Zentrifugation unter voranstehenden Bedingungen mit 3,5 ml einer eiskalten $CaCl_2$ /Glycerol-Lösung (85 % 100 mM $CaCl_2$, 15 % Glycerol), resuspendiert und die so generierten, kompetenten Zellen à 50 µl auf Trockeneis aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

D.2.1.2 *Transformation chemisch kompetenter E. coli-Stämme*

Für die Transformation wurden die *E. coli*-Aliquots auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe eines definierten Volumens des Ligationsansatzes erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen auf Eis. Daraufhin wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden durchgeführt und die Zellen für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Unmittelbar danach wurden 250 µl S.O.C.-Medium zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 1 Stunde bei 200 Upm geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension zur Selektion auf die aufgenommene Plasmid-DNA auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Als Antibiotika kamen dabei entweder Ampicillin (Endkonzentration 200 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zum Einsatz. Die Stocklösung für Ampicillin wurde durch Lösen von 200 mg/ml Ampicillin in 70 % Ethanol hergestellt. Für die Kanamycin-Stocklösung wurden 50 mg/ml in Wasser gelöst und mittels eines 0,22 µm Filters steril filtriert. Beide Antibiotika wurden in aliquotierter Form bei -20 °C aufbewahrt.

D.2.1.3 *Stammhaltung von E. coli*

Die auf Agarplatten ausgestrichenen Bakterien wurden maximal für 6 Wochen bei 4 °C gelagert. Für eine längerfristige Konservierung wurde eine Glycerin-Stammkultur von

einer Einzelkolonie ausgehend erstellt. Hierfür wurden 3 ml einer Übernachtskultur mit 530 µl Glycerin (100 %) versetzt und nach Durchfrieren bei -80 °C aufbewahrt.

D.2.1.4 Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von Bakterien für eine nachfolgende Plasmidisolierung wurde eine definierte Menge DYT-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt. Mittels einer ausgeglühten Impföse oder einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie der Bakterien von einer Masterplatte aufgenommen und in das Medium eingebracht. Diese Lösung wurde bei 37 °C über Nacht mit 200 Upm geschüttelt und am darauffolgenden Tag entsprechend den jeweiligen Vorgaben des verwendeten Kits zur Plasmidisolierung sedimentiert.

D.2.2 Molekularbiologie

D.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von gewünschten DNA-Fragmenten mittels PCR *in vitro* wurde die Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase der Fa. New England Biolabs eingesetzt. Diese Polymerase weist eine *proof reading*-Funktion auf, was bedeutet, dass sie neben der 5'→3' DNA-Polymerase Aktivität über eine 3'→5' Exonuklease Aktivität verfügt. Das entstehende PCR-Produkt weist daher glatte Enden auf. Ein typischer Reaktionsansatz sowie die PCR-Bedingungen sind Tab. D-4 und Tab. D-5 zu entnehmen. Bei der Amplifikation bildeten Denaturierung, Annealing und Elongation einen Zyklus, der insgesamt 35 Mal durchlaufen wurde. Sollte das PCR-Produkt anschließend TOPO-TA kloniert werden, so wurde eine PCR mit der Taq-DNA-Polymerase der Fa. Qiagen angeschlossen, welche eine Matrizen-unabhängige, terminale Transferase-Aktivität besitzt, wodurch einzelne Desoxyadenosin-Moleküle an die 3'-Enden des PCR-Produktes angehängt werden.

Tab. D-4: Pipettierschema für einen PCR-Reaktionsansatz.

Komponente	Volumen/Ansatz	Endkonzentration
Wasser	x µl	
5x Phusion HF Puffer inkl. 7,5 mM MgCl ₂	10 µl	1x inkl. 1,5 mM MgCl ₂
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM pro dNTP
10 µM forward Primer	2,5 µl	0,5 µM
10 µM reverse Primer	2,5 µl	0,5 µM
DNA-Matrize	x µl	1 pg-500 ng
Phusion Hot Start DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
Totalvolumen	50 µl	

Tab. D-5: PCR-Bedingungen.

Schritt	Temperatur	Dauer
Anfangsdenaturierung	98 °C	30 Sekunden
Denaturierung	98 °C	10 Sekunden
Annealing	60-72 °C, Primer-abhängig	30 Sekunden
Elongation	72 °C	15-30 Sekunden/kb
Finale Elongation	72 °C	10 Minuten
	4 °C	∞

D.2.2.2 TOPO-TA Klonierung

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten mit 3'-überhängenden Desoxyadenosin-Molekülen wurden diese in den Vektor pCR®2.1-TOPO® der Fa. Invitrogen kloniert und mit den angegebenen Standardprimern sequenziert. Dazu wurde der in Tab. D-6 aufgeführte Reaktionsansatz 5-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in OneShot® TOP10 chemisch kompetente *E. coli* transformiert.

Tab. D-6: Reaktionsansatz für eine TOPO-TA Klonierung.

Komponente	Volumen/Reaktion
PCR-Produkt	0,5-4 µl
Salzlösung	1 µl
TOPO®-Vektor	1 µl
Wasser	0-3,5 µl
Totalvolumen	6 µl

D.2.2.3 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe erfolgte eine Auftrennung derselben mittels Elektrophorese in 0,8-3 %igen Agarosegelen, wobei sich die Konzentration der Agarose nach der Fragmentgröße richtete. Für die Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle für 4 Minuten bei 600 W gelöst. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,05 % zugegeben und die Gele in die vorbereiteten Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer versehen, neben einem geeigneten Molekulargewichtsmarker in die Taschen des ausgehärteten Gels aufgetragen und mit 5-7 V/cm elektrophoretisch in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Visualisierung der DNA aufgrund der Interkalation von Ethidiumbromid erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei 302 nm.

D.2.2.4 Elution von DNA aus Agarosegel

Aus dem Agarosegel ausgeschnittene DNA-Banden wurden mit dem MinElute® Gel Extraction Kit der Fa. Qiagen isoliert. Nach Zugabe der dreifachen Menge an Solubilisierungspuffer wurde das Agarosegelstück 10 Minuten bei 50 °C geschmolzen, wobei zur Verbesserung der Solubilisierung alle 2-3 Minuten gevortext wurde. Bei neutralem bis leicht saurem pH und unter Anwesenheit einer hohen Menge an chaotropen Salzen erfolgte die Bindung des zu isolierenden DNA-Fragmentes an die Silika-Membran durch Zentrifugation bei 16.100 x g für eine Minute. Zur Entfernung überschüssiger Salze erfolgte ein Waschschriff mit Ethanol-haltigem Puffer unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen. Abschließend wurde die Säule trocken zentrifugiert und die DNA mit 10 µl Wasser eluiert.

D.2.2.5 Restriktion von DNA

Restriktionsanalysen wurden mit spezifischen RE vom Typ II der Fa. New England Biolabs in den angegebenen Reaktionspuffern bei den für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Diese RE spalten dsDNA innerhalb spezifischer, meist palindromischer Erkennungssequenzen, wobei je nach Art der RE entweder glatte oder überhängende Enden entstehen. Die Enzymaktivität der RE wird in Units (U) angegeben. Eine U ist dabei definiert als die Menge an Enzym, die nötig ist, um 1 µg DNA des Phagen λ (48.000 bp) in einer Stunde unter optimalen Reaktionsbedingungen komplett zu verdauen. Anhand dessen lässt sich die einzusetzende Menge U wie folgt berechnen:

$$\text{Menge an RE [U]} = \frac{\text{Anzahl Nukleotide im Phagen } \lambda}{\text{Anzahl Nukleotide im Vektor bzw. Insert}} \times \frac{\text{Schnittstellen im Vektor bzw. Insert}}{\text{Schnittstellen im Phagen } \lambda}$$

Für eine analytische Restriktion, die der Überprüfung aus *E. coli* isolierter Plasmide diente, wurde 1 µg DNA für eine Stunde verdaut. Handelte es sich dagegen um eine präparative Restriktion mit dem Ziel der Subklonierung der entsprechenden DNA-Sequenz, so wurden 2,5 pmol DNA für 3 Stunden restringiert. Entsprechend die DNA-Menge bei 2,5 pmol weniger als 5 µg, so wurden aufgrund der zu erwartenden Verluste bei der Gelaufreinigung mindestens 5 µg DNA verdaut. In beiden Fällen erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der entstandenen DNA-Fragmente im Agarosegel. Fragmente für die Subklonierung wurden anschließend für die Folgeschritte aus dem Gel eluiert.

D.2.2.6 Klenow-vermittelte Auffüllreaktion

Das Klenow-Fragment (Klenow and Henningsen, 1970) entspricht der großen Untereinheit der DNA Polymerase I von *E. coli*, welches durch eine proteolytische Spaltung mit Subtilisin generiert wird. Dieses Enzym verfügt noch über die 5'→3' DNA-Polymerase- und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, wohingegen die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität fehlt. Bei der Restriktion von DNA entstehende 5'-überhängende Enden können durch die Auffüllreaktion mit Klenow in glatte Enden überführt werden. Hierfür wurde das Klenow-Fragment der Fa. New England Biolabs verwendet und der in Tab.

D-7 angegebene Ansatz für 15 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM und Erhitzen auf 75 °C für 20 Minuten.

Tab. D-7: Ansatz für eine Klenow-Auffüllreaktion.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10x NEB-Puffer 2	2 µl	1x
DNA-Matrize	x µl	1 µg
10 mM dNTPs	0,7 µl	33 µM pro dNTP
Klenow-Enzym (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
Wasser	x µl	
Totalvolumen	20 µl	

D.2.2.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um bei präparierten Vektorfragmenten mit den gleichen Enden die Wahrscheinlichkeit einer Religation zu reduzieren, wurde das entsprechende Fragment einer Dephosphorylierung mit der Antarktischen Phosphatase der Fa. New England Biolabs unterzogen. Dabei erfolgte die Abspaltung freier 5'-Phosphatgruppen durch Hydrolyse.

D.2.2.8 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die mittels Hybridisierung generierten Oligonukleotide, die als Insert in einer Ligationsreaktion dienen sollten, wurden mit der T4 Polynukleotid Kinase der Fa. New England Biolabs behandelt. Das Enzym katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe an das 5'-Ende des jeweiligen Oligonukleotids, wobei ATP als Phosphatquelle dient.

D.2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation zweier DNA-Fragmente erfolgte unter Einsatz der T4 DNA-Ligase der Fa. Roche. Diese katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einem 5'-Phosphatrest in dsDNA. Für die Reaktion selbst wurden der Zielvektor und das Insert im molaren Verhältnis 1:3 mit einer Gesamtmenge von 300 ng eingesetzt, mit 1 U T4 DNA-Ligase versehen und entweder für eine Stunde bei 16 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die einzusetzende Menge an Vektor und Insert wurde mit folgender, in unserem Labor von Frau Dr. Marei Drechsel entwickelten Formel berechnet, wobei a den molaren Überschuss des Inserts angibt:

$$\text{Menge des Inserts (ng)} = a \cdot \left\{ 300 \text{ ng} : \left[\frac{\text{Nukleotide Vektor (bp)}}{\text{Nukleotide Insert (bp)}} + a \right] \right\}$$

Die Menge des Vektors (ng) ergibt sich dementsprechend aus der Differenz der Gesamtmenge von 300 ng und der Menge des Inserts (ng).

D.2.2.10 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und erfolgte unabhängig vom Maßstab der Plasmidpräparation (Mini-Präparation oder Midi-Präparation) basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Hierfür wurden die Zellen bei 5.000 x g zentrifugiert und das Sediment mit einem Rnase-haltigen Puffer resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe einer Lösung, die neben NaOH auch SDS enthielt. Zur Neutralisation und Ausfällung von gDNA sowie von Proteinen wurde eine Lösung aus Eisessig und Kaliumacetat zugegeben. Nach Bindung der in Lösung vorliegenden bakteriellen DNA an eine Säule erfolgte nach mehreren Waschschritten zur Entfernung von Kontaminationen wie RNA und Proteinen die Elution im jeweilig angegeben Lösungsmittel.

Für Mini-Präparationen, die zum Screening von diversen Klonen bei Klonierungsexperimenten nötig waren, wurde der peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I der Fa. Peqlab Biotechnology verwendet. Dabei wurde die Plasmid-DNA an eine Silika-Gel-Membran gebunden, nicht DNA-haltige Bestandteile durch Waschschriffe entfernt und die DNA mit Wasser eluiert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA für den Einsatz in der Zellkultur kam der HiSpeed Midi Kit der Fa. Qiagen zum Einsatz. In diesem Fall wurde die bakterielle DNA unter Nidrigsalz-Bedingungen an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden. Durch einen Waschschriff mit Puffer mittlerer Salzkonzentration wurden Verunreinigungen entfernt, bevor die DNA mit einem Puffer hoher Salzkonzentration eluiert wurde. Nach Entsalzung und Aufkonzentrierung der DNA durch Präzipitation mit Isopropanol wurde die DNA in Endotoxin-freiem TE-Puffer aufgenommen, da Endotoxine die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen würden.

D.2.2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels NanoDrop™

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren bei einer optischen Dichte von 260 nm (OD_{260}) wurde das NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer verwendet. Dabei werden die sogenannte „receiving fiber“ und die „source fiber“ durch die zu vermessende Probe verbunden. Ein gepulster Xenonblitz, der durch die Probe geschickt wird, dient der Ermittlung der Konzentration. Die Initialisierung des Spektrophotometers, die dazu dient die vorliegenden Umwelteinflüsse zu erfassen, erfolgte mit Wasser. Der Leerwert wurde mit der entsprechenden Elutionslösung eingestellt, bevor die Probe, DNA oder RNA, gemessen wurde. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} wurde zur Bewertung der Reinheit herangezogen. Für reine DNA erwartet man ein Verhältnis von $\sim 1,8$, wohingegen das Verhältnis für reine RNA bei $\sim 2,0$ liegt.

D.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte DNA-Sequenzierung erfolgte mittels Fluoreszenz-markierten Didesoxyribonukleotiden (ddNTPs) (Sanger et al., 1977) und wurde entweder von der Fa. Sequiserve (Vaterstetten) oder von der Fa. Eurofins MWG Operon (Ebersberg)

durchgeführt. Dabei wird die zu sequenzierende DNA-Probe mit dem Sequenzierprimer, der DNA-Polymerase und den vier Nukleotiden versehen. Zusätzlich werden noch ddNTPs, die mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind, zugegeben. Wird während der Synthese ein ddNTP eingebaut, kommt es an dieser Stelle zu einem Kettenabbruch, da keine 3'-OH-Gruppe für die Reaktion mit der 5'-Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids zur Verfügung steht. Die dadurch entstehenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und gleichzeitig durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Ein Detektor zeichnet die vier verschiedenen Fluoreszenzen (eine für jedes ddNTP) entsprechend der Größe der Abbruchprodukte als Elektropherogramm auf, welches direkt die Basenabfolge der Sequenzierprobe darstellt.

D.2.2.13 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Isolierung von Total-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem Rneasy Mini Kit der Fa. Qiagen aus 6-Kavitäten-Zellkulturplatten. Dessen Prinzip basiert auf der Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran und deren Elution mit Rnase-freiem Wasser. Dazu wurden die adhärennten Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, um Medienrückstände zu entfernen, die aufgrund des darin enthaltenen Serums zu Proteinverunreinigungen führen könnten. Durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer pro Kavität wurden die Zellen vollständig lysiert, wobei dem RLT-Puffer zur Denaturierung von Rnasen 1 % des Reduktionsmittels β -Mercaptoethanol beigelegt wurde. Die Homogenisierung des Lysats wurde mit Hilfe einer QIAshredder-Säule erreicht, die bei 16.100 x g für zwei Minuten zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Lysat mit der äquivalenten Menge an 70 %igem Ethanol versetzt, da die daraus resultierende Ethanolkonzentration von 35 % eine optimale Bindung der RNA an die Rneasy-Mini-Säule erlaubt. Das Lysat-Ethanol-Gemisch wurde auf eine Rneasy-Mini-Säule pipettiert, 15 Sekunden bei 16.100 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und Zentrifugation unter voranstehenden Bedingungen wurde die nicht RNA-haltige Fraktion entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µl RPE-Puffer unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen wurde die Rneasy-Mini-Säule unter Verwendung eines neuen Sammelröhrchens trocken zentrifugiert. Die abschließende Elution der RNA erfolgte durch eine 1-minütige Zentrifugation mit 30 µl Rnase-freiem Wasser.

D.2.2.14 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben von isolierter Total-RNA in einzelsträngige cDNA wurde der QuantiTect Reverse Transcription Kit von der Fa. Qiagen verwendet. Dabei werden zwei verschiedene Arten von Primern eingesetzt: zum einen Oligo-dT-Primer, die an den 3'-PolyA-Schwanz der mRNA binden, und zum anderen Zufalls-Hexamer-Primer, die mit diversen Regionen der RNA hybridisieren können. Des Weiteren kommen bei der cDNA-Synthese zwei von drei wichtigen Eigenschaften des multifunktionalen Enzyms reverse Transkriptase zum Einsatz. Einerseits die RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität, welche für das Umschreiben der RNA in cDNA verantwortlich ist. Andererseits verfügt

dieses Enzym über eine Rnase H-Aktivität, die für die spezifische Degradation der RNA in RNA-cDNA-Hybriden sorgt.

Für die reverse Transkription wurden 250 ng RNA in einem Volumen von 12 µl mit 2 µl gDNA *wipeout buffer* versetzt und bei 42 °C für 3 Minuten in einem Thermocycler inkubiert, um die gDNA zu verdauen. Die Proben wurden auf Eis gestellt und nach Zugabe des in Tab. D-8 aufgeführten Ansatzes wurde die reverse Transkription bei 42 °C für 30 Minuten durchgeführt. Den abschließenden Schritt stellte die Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase bei 95 °C für 3 Minuten dar.

Tab. D-8: cDNA-Ansatz für die reverse Transkriptionsreaktion.

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl	
Quantiscript RT-Puffer, 5x	4 µl	1x
RT-Primer-Mix	1 µl	
Gesamt-RNA nach gDNA-Eliminierungsreaktion	14 µl	
Totalvolumen	20 µl	

D.2.2.15 quantitative RT-PCR

Der quantitative Nachweis von mRNA-Transkripten erfolgte mit dem LightCycler® 1.5-System in Kombination mit dem LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit der Fa. Roche. SYBR Green I ist ein fluoreszierender Cyanin-Farbstoff, der die Eigenschaft besitzt, in dsDNA zu interkalieren, wodurch seine Fluoreszenz ansteigt. Die Amplifikation des spezifischen dsDNA-Produktes korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus, die durch das LightCycler® System detektiert wird. Der dsDNA-SYBR Green I-Komplex absorbiert dabei Licht blauer Wellenlänge und emittiert grünes Licht. Neben dem spezifischen dsDNA-Produkt stellen auch Primerdimere, unspezifische dsDNA-Produkte, ssDNA und RNA mögliche Interaktionspartner für SYBR Green I dar, wobei das entsprechende Fluoreszenzsignal aber deutlich geringer ausfällt.

Des Weiteren wurden für die qRT-PCR Primer-Sets der Fa. Search-LC eingesetzt, die einen Standard mit genau definierter Kopienzahl und ein entsprechendes Primer-Paar für das nachzuweisende Transkript enthalten. Über eine Verdünnungsreihe des Standards wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Kopienzahl in der zu analysierenden Probe ermittelt wurde. Die PCR-Bedingungen sind in Tab. D-9 zusammengefasst und richteten sich nach der Angabe des verwendeten Primer-Sets. Die Abfolge aus Denaturierung, Annealing und Elongation stellt einen Zyklus dar, der insgesamt 40 Mal und mit einer Fluoreszenzverstärkung von 5 durchgeführt wurde. Im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse erfolgte zuerst eine 20-sekündige Denaturierung bei 95 °C mit anschließender Inkubation bei 58 °C für 10 Sekunden, die eine erneute Dimerisierung der Amplifikationsprodukte erlaubte. Für die Bestimmung des Schmelz-

punktes, welcher für das jeweilige Amplifikationsprodukt spezifisch ist, schloss sich eine graduelle Erhöhung der Temperatur von 58 °C auf 95 °C mit einem Intervall von 0,1 °C pro Sekunde an. Der Schmelzpunkt ist charakterisiert durch die Auftrennung der dsDNA in zwei ssDNA-Moleküle, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird, was als Fluoreszenzabnahme registriert wird. Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht es, unspezifische Produkte sowie Primerdimere zu identifizieren. Neben der Schmelzkurvenanalyse wurde zum Nachweis spezifischer Produkte auch eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Eine Kühlphase von 30 Sekunden bei 40 °C schloss den Prozess der qRT-PCR ab.

Tab. D-9: Amplifikationsbedingungen für die qRT-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
Anfangsdenaturierung	95 °C	10 Minuten
Denaturierung	95 °C	10 Sekunden
Annealing	68 °C	10 Sekunden
Elongation	72 °C	16 Sekunden

Für die Reaktion selbst wurde je 1 µl cDNA mit 5 µl Wasser, 1 µl Primer-Set und 3 µl PCR-Mastermix in eine Glaskapillare pipettiert. Der PCR-Mastermix enthielt den Farbstoff SYBR Green I, die DNA-Polymerase, den PCR-Puffer und die dNTPs. In allen Ansätzen lag MgCl₂ in einer Endkonzentration von 1 mM vor. Nach Zentrifugation der Glaskapillaren bei 2.400 Upm für 4 Minuten wurden diese mit einem Stopfen verschlossen und vorsichtig in das vorgesehene LightCycler®-Karussell überführt.

D.2.3 Proteinbiochemie

D.2.3.1 Isolierung cytosolischer Proteine

Um cytosolische Proteine wie APC, β-Catenin oder GAPDH zu isolieren, wurde das Kultivierungsmedium entfernt und die entsprechend behandelten hMSC mit 1x PBS gewaschen, trypsinisiert und für 5 Minuten bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 1x PBS und einer Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wurde das jeweilige Sediment mit einem definierten Volumen cytosolischen Lysepuffers versetzt. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert und zur Steigerung der Lyse-Effizienz alle 10 Minuten gevortext. Danach wurden die Lysate 15 Minuten mit 16.100 x g bei 4 °C zentrifugiert und die entsprechenden Überstände in neuen Reaktionsgefäßen mit 5x Lämmli-Auftragspuffer versetzt.

D.2.3.2 Isolierung membranständiger Proteine

Zur Isolierung der membranständigen LRPs wurden hMSC bis zum entsprechenden Zeitpunkt kultiviert, nach Entfernung des Kultivierungsmediums mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und sofort auf Eis gestellt. Durch Zugabe eines definierten Volumens Maquoi-Lysepuffer erfolgte die Lyse der Zellen für 10 Minuten auf Eis. Nach dem

Abschaben der Zellen wurden diese für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei alle 10 Minuten gevortext wurde, um die Effizienz der Lyse zu erhöhen. Abschließend erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 16.100 x g und 4 °C. Der jeweilige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5x Lämmli-Auftragspuffer versehen.

Für die Isolierung der Wnt-Korezeptoren aus transient transfizierten HEK-293 wurden diese an Tag 2 nach Transfektion mit den entsprechenden LRP-Expressionsplasmiden unter Verwendung des Lysepuffers nach Leeb-Lundberg lysiert. Dazu wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit eiskaltem 1x PBS mit 100 µl Lysepuffer abgeschabt und auf Eis inkubiert. Die Folgeschritte waren analog zur Isolierung der Proteine aus hMSC mittels des Maquoi-Lysepuffers.

D.2.3.3 Proteinnachweis mittels Western Blot

Der Proteinnachweis mit Hilfe eines Western Blot lässt sich in die 3 nachfolgenden Schritte gliedern.

D.2.3.3.1 Reduzierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zunächst erfolgte die Auftrennung von Proteinlysaten mittels diskontinuierlicher Elektrophorese (Laemmli, 1970), bei der die Proteine zuerst in einem Sammelgel aufkonzentriert und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt werden. Die beiden SDS-haltigen Gele unterscheiden sich bezüglich der Porengröße und des pH-Wertes. Als Puffer-System kam SDS-haltiges TRIS-Glycin zum Einsatz. Das Detergenz SDS führt zur Denaturierung der Proteine und verleiht diesen durch seine Anlagerung negative Ladungen, wodurch die Auftrennung entsprechend dem Molekulargewicht ermöglicht wird. Für den Nachweis von APC und der LRPs wurden Gele mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 6 % verwendet, während für β-Catenin und GAPDH 10 %ige Polyacrylamid-Gele zum Einsatz kamen. Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele nach Sambrook ist nachstehender Tab. D-10 zu entnehmen.

Tab. D-10: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.

Komponente	Trenngel (5 ml)		Sammelgel (5 ml)
	6 %	10 %	5 %
dH ₂ O	2,9 ml	2,4 ml	3,64 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	---
1 M TRIS pH 6,8	---	---	630 µl
Rotiphorese® Gel 40 (37,5 : 1)	750 µl	1,25 ml	625 µl
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	4 µl	2 µl	5 µl

Zur Denaturierung von Disulfidbindungen durch Reduktion wurden die mit DTT-haltigem Auftragspuffer versehenen Proteinproben 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und neben einem farbigen Molekulargewichtsmarker in die Geltaschen aufgetragen. Die

elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer für 90-150 Minuten bei 120 V mit der Mini PROTEAN® Electrophoresis Cell Einheit der Fa. BioRad.

D.2.3.3.2 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran, wofür die Mini Transblot Electrophoretic Transfer Cell Einheit der Fa. BioRad verwendet wurde. Vor dem Transfer wurde die Membran für 15 Minuten in Methanol-haltigem 1x Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden die notwendigen Komponenten wie folgt zusammengesetzt: Kathode, Schwamm, 2x Filterpapier, Gel, Membran, 2x Filterpapier, Schwamm, Anode. Der Transfer selbst erfolgte für 90 Minuten bei 70 mA pro Gel in 1x Transferpuffer. Die einzige Ausnahme bildete der Transfer für den Nachweis von APC, der aufgrund des hohen Molekulargewichts von APC für 120 Minuten durchgeführt wurde.

D.2.3.3.3 Detektion der Proteine

Abschließend erfolgte die Immundetektion (Gershoni and Palade, 1983) der Zielproteine im Fall der LRPs entweder mit primären HRP-Konjugaten, gerichtet gegen die jeweilige *tag*-Sequenz, oder mit endogenen Antikörpern gegen LRP5 bzw. LRP6 unter Einsatz des TBS-T-Puffersystems. Für die Detektion der cytosolischen Proteine wurden ausschließlich gegen entsprechend endogene Sequenzen gerichtete Antikörper verwendet. Zunächst wurde die Membran mit einer 5 %igen Magermilch-Lösung 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um die ungesättigten Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nach kurzem Waschen mit 1x TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen primären HRP-Konjugat oder mit den entsprechenden endogenen Primär-Antikörpern, verdünnt in 1x TBS-T, über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper-Verdünnungen sind nachfolgender Tab. D-11 zu entnehmen.

Tab. D-11: Verdünnungen der primären Antikörper.

Antikörper	Verdünnung in 1x TBS-T	Zellen
anti-Flag-HRP	1:1.000	HEK-293; hMSC
anti-HA-HRP	1:2.000	HEK-293; hMSC
anti-APC	1:250	hMSC
anti-β-Catenin	1:1.000	hMSC
anti-GAPDH	1:10.000	hMSC
anti-LRP5 (<i>goat</i>)	1:500	HEK-293
anti-LRP5 (<i>rabbit</i>)	1:250	hMSC
anti-LRP6	1:1.000	HEK-293
	1:250	hMSC

Danach wurde wiederum 3x 10 Minuten mit 1x TBS-T gewaschen. Bei den endogenen Antikörpern wurde eine 1-stündige Inkubation mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundär-Antikörper in der Verdünnung 1:10.000 in 1x TBS-T angeschlossen, bevor wiederum mit 1x TBS-T 3x 10 Minuten gewaschen wurde. Für die Visualisierung

mittels Chemilumineszenz wurde die Membran 5 Minuten mit dem Substrat Western-Lightning® Plus-ECL der Fa. PerkinElmer inkubiert.

D.2.3.4 *Gaussia Luciferase-Aktivitätsmessung*

Die Bestimmung der Gaussia Luciferase-Aktivität wurde unter Verwendung des Gaussia-Juice Kits der Fa. PJK bewerkstelligt. Bei der Gaussia Luciferase handelt es sich um ein Reporterprotein, welches nach Sekretion in den Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Die Bildung der Gaussia Luciferase wird durch das TCF/LEF-Reportergen-Plasmid pN3-Bar-Gluc vermittelt, welches entweder stabil in das Genom der hMSC integriert oder mittels Kotransfektion in hMSC eingebracht wurde. Dieses Plasmid ermöglicht die Visualisierung von Wnt/ β -Catenin-abhängigen Prozessen in hMSC aufgrund der subzellulären Lokalisation der transkriptionell aktiven Fraktion von β -Catenin. Nur nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern, gefolgt von einer Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, wird das Reporterprotein Gaussia Luciferase exprimiert und von den Zellen sezerniert. Für die Bestimmung der Gaussia Luciferase-Aktivität nach Stimulation oder Transfektion der Zellen wurden 25 μ l Zellkulturüberstand in eine schwarze 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert und mit 50 μ l Substratlösung versehen, wobei das 50x konzentrierte Gaussia Luciferase Substrat Coelenterazin unmittelbar vor der Messung bei 470 nm in dem beiliegenden Puffer verdünnt wurde.

D.2.4 Zellbiologie

D.2.4.1 *hMSC*

D.2.4.1.1 Kryokonservierung von Zellen

Das Prinzip der Kryokonservierung basiert auf der Erhaltung der Vitalität der eingefrorenen Zellen durch eine sogenannte Kältestarre, bei der die Stoffwechselvorgänge nahezu zum Stillstand kommen. Dem verwendeten Einfriermedium muss jedoch ein geeignetes Gefrierschutzmittel zugesetzt werden, welches die Entstehung von Eiskristallen aus Wasser deutlich herabsetzt, da diese zu irreparablen Schäden der Zellwände führen würden.

Für die Kryokonservierung der hMSC-Populationen wurde zunächst deren Zellzahl bestimmt. Die sedimentierten Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen und in 1ml-Aliquots mit einer Zellzahl von $0,5-1,0 \times 10^6/\text{ml}$ auf die Kryoröhrchen verteilt. Vor der abschließenden Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden diese 2 Stunden bei -20°C und über Nacht bei -80°C eingefroren.

D.2.4.1.2 Kultivierung von hMSC

Die kryokonservierten Zellen wurden zum Auftauen 2 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert und sogleich in 10 ml vorgewärmtem Kultivierungsmedium aufgenommen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur und $500 \times g$ wurde der Überstand abgenommen und das Sediment mit 1 ml Kultivierungsmedium vorsichtig

resuspendiert. Zur Aussaat mit der gewünschten Zelldichte wurden die hMSC in 75 cm²-Zellkulturflaschen (T75) mit vorgewärmtem Kultivierungsmedium verteilt, wobei das Endvolumen 10 ml pro T75-Zellkulturflasche betrug. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung. Zweimal pro Woche wurde das Kultivierungsmedium gewechselt, wobei ein Waschschrift mit 1x PBS vorausging, um mögliche Zelldebris zu entfernen.

D.2.4.1.3 Subkultivierung konfluenter hMSC

Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 % wurden die hMSC entweder zum Einfrieren geerntet oder subkultiviert. Dies setzte ein Ablösen der adhärennten Zellen durch den Einsatz von Trypsin/EDTA voraus. Dazu wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und die adhärennten Zellen mit 1x PBS gewaschen. Dies diente sowohl der Entfernung etwaiger Medienrückstände, welche durch das darin enthaltene Serum eine Inaktivierung des Trypsins hätten bewirken können, als auch der Minimierung der Anzahl zweiwertiger Ionen, die mit EDTA einen Chelatkomplex eingehen würden. Nach Zugabe einer 1x Trypsin/EDTA-Lösung erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 7 Minuten, um das Ablösen der adhärennten Zellen zu bewirken. Durch die Zugabe von Kultivierungsmedium wurde diese Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 500 x g sedimentiert und nach Resuspension des Sediments in neue Zellkulturkavitäten überführt.

D.2.4.1.4 Klonale Expansion

Um eine möglichst große Anzahl an hMSC zur Verfügung zu haben, wurden die vom Prockop-Labor bezogenen, kryokonservierten hMSC klonal expandiert. Dazu wurden die Zellen (1×10^6) aufgetaut und für 24 Stunden in einer T75-Kulturflasche bei 37 °C inkubiert. Nachdem die nicht adhärennten Zellen durch einen Waschschrift mit 1x PBS entfernt waren, wurden die adhärennten Zellen mit einer 1x Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in Kultivierungsmedium aufgenommen und zentrifugiert. Das Sediment wurde vorsichtig resuspendiert und die hMSC mit einer Dichte von 50 Zellen/cm² Kulturfläche in T175-Zellkulturflaschen in einem Endvolumen von 15 ml ausgesät. Nach 3-4 Wochen Kultivierung hatten die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht und wurden als 1 ml Aliquots mit $0,5-1,0 \times 10^6$ Zellen eingefroren.

D.2.4.1.5 Lipofektion von Plasmid-DNA oder siRNA

Das zugrunde liegende Prinzip der Lipofektion beruht auf der Wechselwirkung des kationischen, amphiphilen Transfektionsreagenzes mit der anionischen Nukleinsäure. Dabei entstehen durch Komplexbildung Mizellen, die von den Zellen durch Endocytose aufgenommen werden können.

Die Lipofektion von DNA bzw. siRNA wurde nach der gleichen Vorgehensweise durchgeführt, lediglich die eingesetzte Menge an DNA bzw. siRNA und Lipofectamine 2000 variierte. Bei der transienten Transfektion von DNA wurden pro cm² Kulturfläche 0,2 µg DNA und eine darauf bezogene 1,5-fache Volumenmenge Lipofectamine 2000 verwendet, während die siRNA in einer Konzentration von 40 nM mit der darauf bezogenen

2-fachen Volumenmenge Lipofectamine 2000 eingesetzt wurde. Eine Ausnahme bildeten die LRP-Plasmide, von denen aufgrund der Plasmidgröße 0,3 µg DNA pro cm² Kulturfäche für die Transfektion verwendeten wurden. Für die transiente Kotransfektion wurden 80 % des gewünschten Plasmides und 20 % des Reporter-Gen-Plasmides pN3-Bar-Gluc verwendet. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 30 % ausgesät. Für die Transfektion selbst wurden die Nukleinsäure und das Lipofectamine 2000 getrennt voneinander in je 250 µl Serum-freiem DMEM aufgenommen und nach 5 Minuten Inkubationszeit miteinander vermischt. Die anschließende 20-minütige Inkubation dieser Lösung bei Raumtemperatur ermöglichte die Bildung der sogenannten Lipoplexe. Unterdessen wurde das Medium bei den zu transfizierenden Zellen erneuert und abschließend die Transfektionslösung tropfenweise zugegeben. Nach 6 Stunden Inkubationszeit im Brutschrank wurde das Medium der transfizierten Zellen gewechselt.

Sollten durch die Transfektion mit den entsprechenden Plasmiden Zellen mit stabil integriertem Transgen selektioniert werden, so wurde dem Kultivierungsmedium 48 Stunden nach Transfektion das Antibiotikum Geneticin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Die Selektion erfolgte 2-3 Wochen lang, wobei die nicht transfizierten Zellen als Kontrolle für den Antibiotika-Selektionsdruck fungierten. Für die weitere Verwendung wurden die Zellen immer unter Einsatz des Selektionsantibiotikums kultiviert.

D.2.4.1.6 Stabile, ortsspezifische Integration mit der ΦC31-Integrase

Für eine stabile und zugleich ortsgerichtete Integration von Plasmid-DNA in das Genom von hMSC wurde das ΦC31-Integrase-System verwendet. Diese Integrase stammt aus dem Bakteriophagen ΦC31 und vermittelt die unidirektionale Rekombination zwischen der bakteriellen Rekombinationssequenz attB und sogenannten pseudo attP-Sequenzen, die über das humane Genom verteilt vorkommen. Dazu wurden die zu integrierende Plasmid-DNA und der Integrase-Expressionsvektor pCMVInt im Verhältnis 4:1 mittels Lipofektion wie unter D.2.4.1.5 beschrieben in hMSC eingebracht. Nach 48 Stunden erfolgte wiederum die Selektion hinsichtlich stabil transfizierter hMSC mit dem Antibiotikum Geneticin.

D.2.4.1.7 Adipogene und osteogene Differenzierung

Zur Differenzierung wurden hMSC 24 Stunden vorher mit einer Konfluenz von 90 % ausgesät. Die Differenzierung erfolgte mit definierten Medien (Jaiswal et al., 1997) über einen Zeitraum von zwei Wochen.

Für die adipogene Differenzierung wurden hMSC abwechselnd mit Induktions- (Tab. D-12) und Erhaltungsmedium (Tab. D-13) kultiviert. Die Differenzierung erfolgte in zwei Zyklen. Dabei wurden die Zellen für fünf Tage mit Induktionsmedium behandelt, woran sich eine 2-tägige Kultivierung mit Erhaltungsmedium anschloss.

Tab. D-12: Zusammensetzung des adipogenen Induktionsmediums.

Komponente	C _{Stocklösung}	C _{End}
α-MEM	-	-
FBS	100 %	10 %
Pen/Strep	10.000 U/ml	100 U/ml
Dexamethason	50 µM	1 µM
IBMX	500 mM	0,5 mM
Indomethacin	50 mM	0,2 mM
Insulin, human	3,5 mg/ml	0,01 mg/ml

Tab. D-13: Zusammensetzung des adipogenen Erhaltungsmediums.

Komponente	C _{Stocklösung}	C _{End}
α-MEM	-	-
FBS	100 %	10 %
Pen/Strep	10.000 U/ml	100 U/ml
Insulin, human	3,5 mg/ml	0,01 mg/ml

Die osteogene Differenzierung erfolgte durch Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums (Tab. D-14), wobei 2x die Woche ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

Tab. D-14: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.

Komponente	C _{Stocklösung}	C _{End}
α-MEM	-	-
FBS	100 %	10 %
Pen/Strep	10.000 U/ml	100 U/ml
α-Ascorbinsäure-P	12,5 mM	50 µM
β-Glycerol-P	2,5 M	10 mM
Dexamethason	50 µM	100 nM

In Tab. D-15 sind die notwendigen Daten zur Herstellung der verschiedenen Stocklösungen zusammengestellt. Alle Stocklösungen wurden vor ihrer weiteren Verwendung steril filtriert, mit Ausnahme von IBMX und humanem Insulin.

Tab. D-15: Übersicht über die verschiedenen Stocklösungen für die Differenzierung.

Komponente	MW [g/mol]	C _{Stocklsg}	Einwaage [g] Komponente	Vol [ml] Stocklsg	Lösemittel
α-Ascorbinsäure-P	289,5	12,5 mM	0,0181	5	<i>Aqua ad inj.</i>
B-Glycerol-P	216,04	2,5 M	1,35	2,5	<i>Aqua ad inj.</i>
Dexamethason*	392,47	50 mM	0,0196	1	<i>Aqua ad inj.</i>
IBMX**	222,24	500 mM	0,1	0,9	DMSO
Indomethacin**	357,8	50 mM	0,0268	1,5	100 % EtOH
Insulin, human	---	3,7 mg/ml	---	---	gelöst

* Vorstufe der 50 µM Stocklösung (6 ml *Aqua ad inj.* + 6 µl 50mM Dexamethason)

** Zum Lösen leicht erwärmen

D.2.4.1.8 Oil Red O Färbung

Um die adipogene Differenzierung nachzuweisen, wurden die mit den adipogenen Medien behandelten hMSC mit Oil Red O gefärbt. Bei Oil Red O handelt es sich um einen löslichen Diazo-Farbstoff, der eine Visualisierung der Lipidvakuolen mittels Rotfärbung erlaubt. Zunächst wurden die Zellen mit kaltem 1x PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Formalin (10 %, neutral gepuffert) für 2 Minuten bei -20 °C fixiert. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem 50 %igen Ethanol erfolgte die Färbung mit einer 0,2 % Oil Red O Färbelösung (Tab. D-16) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurde mit 50 % Ethanol und dH₂O gewaschen. Für die mikroskopische Auswertung wurden die hMSC mit dH₂O überschichtet.

Tab. D-16: Oil Red O Lösungen.

Oil Red O Lösung	Zusammensetzung	Haltbarkeit
0,3 % Stocklösung	150 mg Oil Red O 50 ml Isopropanol	3 Monate
0,2 % Färbelösung, filtriert nach 10 Minuten	12 ml 0,3 % Stocklösung 8 ml dH ₂ O	3 Stunden

D.2.4.1.9 Quantifizierung der Oil Red O Färbung

Zur Quantifizierung des eingelagerten Oil Red O Farbstoffes wurden die hMSC zunächst mit 1x PBS gewaschen. Die Extraktion erfolgte unter Verwendung eines definierten Extraktionspuffers (50 % EtOH, 2 % SDS) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Je Probe wurden 200 µl Lösung in eine klare 96-Loch Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei OD₄₀₅ im ELISA-Reader ermittelt.

D.2.4.2 HEK-293

Für die Zellkulturarbeiten mit HEK-293 galten grundlegend die gleichen Bedingungen wie für die hMSC. Entsprechende Abweichungen sind nachfolgend angegeben.

Auftauen und Kryokonservierung

Zum Auftauen wurde 1 Kryoröhrchen mit 2 x 10⁶ Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellen direkt zu 4 ml vorgewärmtem Medium in einer T25-Zellkulturflasche gegeben. Nach 30 Minuten wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 5 ml neues Kultivierungsmedium ersetzt. Für die Kryokonservierung wurden immer Aliquots à 2 x 10⁶ Zellen in dem entsprechenden Einfriermedium weggefroren.

Kultivierung und Splitten konfluenter Zellen

Während der Kultivierung wurde das Medium 2x die Woche gewechselt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen entweder 1:10 oder 1:20 gesplittet. Dazu wurden die adhärenen Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit einer definierten Menge Kultivierungsmedium wurde ein entsprechendes Volumen der Zellsuspension zu vorgelegtem Medium in einer Zellkulturflasche gegeben und weiter kultiviert.

Lipofektion von Plasmid-DNA

24 Stunden vor der Lipofektion wurden die Zellen mit einer Konfluenz von 100 % in Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten ausgesät, die zuvor mit Poly-D-Lysin (100 µg/ml) beschichtet worden waren. Für die Transfektion wurden 0,4 µg DNA/cm² und eine darauf bezogene 1,5-fache Volumenmenge Lipofectamine 2000 verwendet.

D.2.5 Statistik

Die statistische Signifikanz wurde bestimmt, indem die Mittelwerte \pm Standardabweichung von unabhängigen Triplikaten mit dem Student's T-Test miteinander verglichen wurden. Hierfür kamen die Programme Microsoft Office Excel und SigmaPlot 10.0 zum Einsatz. Als statistisch signifikant wurden p-Werte <0,05 (*), <0,01 (**) oder <0,001 (***) angesehen.

E ERGEBNISSE

Alle aufgeführten Ergebnisse stammen aus Experimenten mit unmodifizierten hMSC oder TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC. Für Stimulationsstudien wurden entweder 75 ng/ml Wnt-3a oder 4 mM LiCl eingesetzt.

E.1 Das TCF/LEF-Reporter-gen-System in hMSC

Wnt-Zielgene tragen innerhalb ihrer Promotorsequenzen eine unterschiedliche Anzahl an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie. Diese Tatsache ist die Grundlage für das sogenannte TCF/LEF-Reporter-gen-System, welches eine quantitative Bestimmung der transkriptionell aktiven β -Catenin Fraktion mit einer hohen Sensitivität ermöglicht. Als Reporter-gen wurde hierfür die Gaussia Luciferase des Tiefsee-Cephalopoden *Gaussia princeps* gewählt. Sie wird erst nach Translokation von β -Catenin in den Zellkern und dessen Assoziation mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren exprimiert und anschließend in den Überstand kultivierter Zellen sezerniert, was die Bestimmung ihrer Aktivität zum einen erleichtert und zum anderen konsekutive Messungen ein und derselben untersuchten hMSC-Population erlaubt.

E.1.1 Vergleichende Analyse des konventionellen TOP/FOP-Flash-Reporter-gen-Systems mit dem TCF/LEF-Reporter-gen-System

Das konventionelle TOP/FOP-Flash-Reporter-gen-System besteht aus den beiden Vektoren pTOP-Gluc und pFOP-Gluc (siehe D.1.5.2). In beiden Vektoren sind die jeweils 8 TCF/LEF-Bindungsstellen durch die gleiche Spacer-Sequenz getrennt. Dadurch können unterschiedliche Rekombinationsereignisse auftreten, welche eine variable Anzahl an TCF/LEF-Bindungsstellen zur Folge haben, was einen bedeutenden Nachteil dieses Systems darstellt. Vor diesem Hintergrund wurde basierend auf den TOP/FOP Flash-Vektoren der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. RT Moon ein TCF/LEF-Reporter-gen-System entwickelt, welches aus den beiden Vektoren pN3-Bar-Gluc und pN3-fuBar-Gluc besteht (siehe D.1.5.2). In diesem System sind die 12 TCF/LEF-Bindungsstellen durch unterschiedliche Spacer-Sequenzen voneinander getrennt, so dass keine Rekombinationsereignisse auftreten sollten. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die höhere Anzahl an TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen, wodurch eine höhere Sensitivität zu erwarten ist.

Zur Evaluierung der Funktionalität des TCF/LEF-Reporter-gen-Systems wurden hMSC transient mit den entsprechenden Vektoren der beiden beschriebenen Systeme transfiziert und die Gaussia Luciferase-Aktivität an Tag 5 nach Transfektion ermittelt (Abb. E-1). Während bei dem konventionellen TOP/FOP-Flash-Reporter-gen-System lediglich eine minimale Zunahme der Gaussia Luciferase-Aktivität nach Applikation von Wnt-3a zu verzeichnen war, führte sowohl die Stimulation mit LiCl als auch mit Wnt-3a beim TCF/LEF-Reporter-gen-System zu einer deutlich gesteigerten Aktivität der Gaussia Luci-

ferase. Alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Reporter-gen-Studien wurden mit diesem TCF/LEF-Reporter-gen-System durchgeführt.

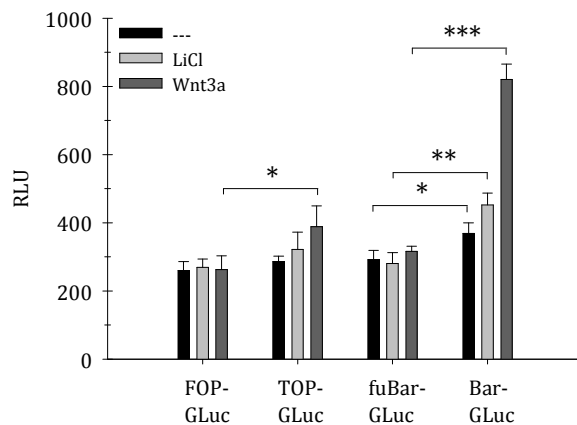


Abb. E-1: Vergleichende Analyse des TOP/FOP-Flash-Reporter-gen-Systems mit dem TCF/LEF-Reporter-gen-System.

hMSC wurden transient mit den entsprechenden Vektoren der beiden Reporter-gen-Systeme transfiziert und die Gaussia Luciferase-Aktivität an Tag 5 nach Transfektion bestimmt.

E.1.2 Transiente Kotransfektion von hMSC mit Plasmiden und pN3-Bar-Gluc

Mit dem Ziel, den Einfluss auf die Expression β -Catenin-abhängiger Zielgene nachzuweisen, wurden hMSC mit dem zu analysierenden Expressionsplasmid und dem TCF/LEF-Reporter-gen-Plasmid pN3-Bar-Gluc transient kotransfiziert. Aus Vorversuchen hatte sich ergeben, dass 20 % Reporter-gen-Plasmid die optimale Menge darstellte, um verlässliche TCF/LEF-Reporter-gen-Studien durchzuführen. Dementsprechend konnten 80 % des jeweiligen Expressionsplasmides eingesetzt werden.

E.1.3 Stabile Transfektion von hMSC mit pN3-Bar-Gluc

Für eine kontinuierliche, zeitlich unbegrenzte Expression des Reporterproteins Gaussia Luciferase war eine stabile Integration des TCF/LEF-Reporter-gen-Plasmides in die gDNA der hMSC notwendig. Dazu wurden hMSC in der 4. Passage mit dem Plasmid pN3-Bar-Gluc in einer Zellkulturplatte mit 6 Kavitäten transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die hMSC einem Antibiotika-Selektionsdruck mit Geneticin ausgesetzt, wodurch nur die hMSC überlebten, die das Reporter-gen-Plasmid stabil in ihre gDNA integriert hatten. Nach 18-21 Tagen konnte bei den selektionierten hMSC klonales Wachstum beobachtet werden, dessen unterschiedliche Stadien in Abb. E-2 dargestellt sind. Diese sogenannten TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC wurden weiterhin unter Selektionsdruck bis in die 7. Oder 8. Passage expandiert, wobei als Kontrolle für die Selektion nicht transfizierte hMSC dienten, die ebenfalls mit Geneticin kultiviert wurden, jedoch den Selektionsdruck nicht überstanden. Als korrespondierende Kontrolle zu den TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC wurden hMSC stabil mit dem Plasmid

pN3-fuBar-Gluc transfiziert. Die entsprechenden hMSC-Populationen mit den mutierten TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen wurden als fuBar-Reportergen-hMSC bezeichnet.

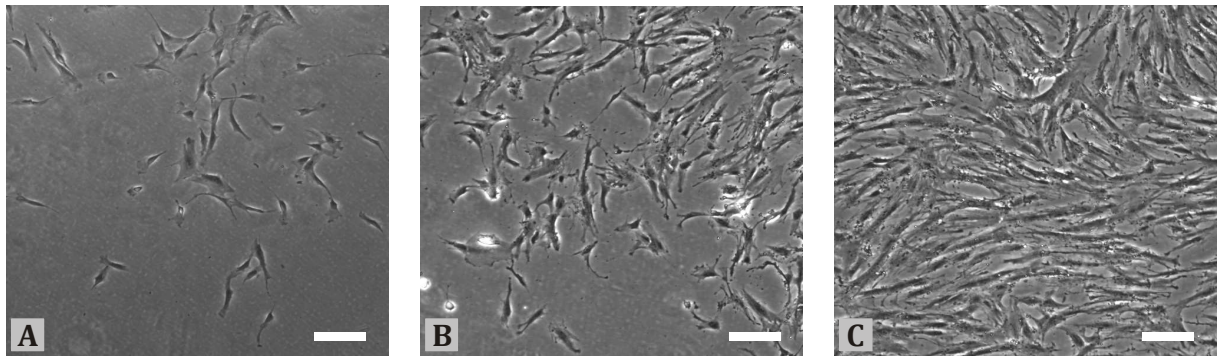


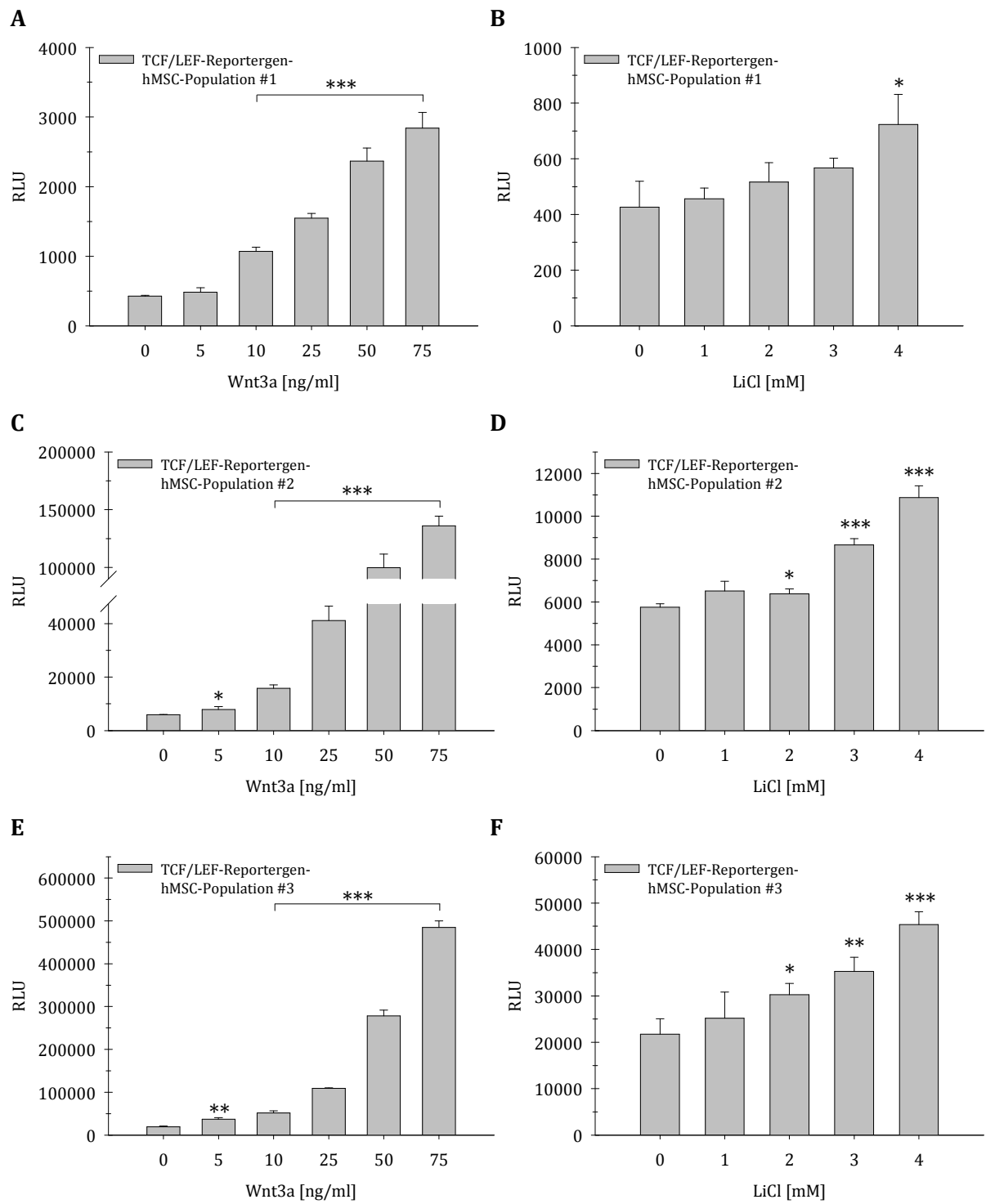
Abb. E-2: Stadien des klonalen Wachstums von hMSC.

Skalierungsbalken = 150 μ M

- A) Zu Beginn des klonalen Wachstums ordneten sich die hMSC nach der Zellteilung mit einem gewissen Abstand zueinander an.
- B) Im Verlauf der Expansion nahm die Konfluenz des Zellklons vom Ursprungszentrum her zu.
- C) Gegen Ende der Expansion bildeten sich Zell-Zell-Kontakte aus, die ohne weiteres Splitten der Zellen zu einem Wachstumsstop aufgrund von Kontaktinhibition führen würden.

E.1.4 Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reportergen-hMSC

Bei der hier durchgeführten, stabilen Transfektion wird das gewünschte Plasmid randomisiert in die gDNA der hMSC integriert. Zum Einsatz für Reportergenstudien war es daher nötig, jede einzelne Population der erhaltenen TCF/LEF-Reportergen-hMSC hinsichtlich der Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität zu überprüfen. Dazu wurden die Populationen in Zellkulturplatten mit 24 Kavitäten ausgesät und mit fünf verschiedenen Konzentrationen von Wnt-3a oder LiCl stimuliert. Nach 5 fünf Tagen wurde im Zellkulturüberstand die Aktivität der Gaussia Luciferase analysiert. In Abb. E-3A-F ist die Gaussia Luciferase-Aktivität von drei verschiedenen, repräsentativen hMSC-Populationen dargestellt. Sowohl die Stimulation mit Wnt-3a als auch die Applikation von LiCl führte unabhängig von der basalen Reportergen-Aktivität der jeweiligen TCF/LEF-Reportergen-hMSC-Population zu einer Dosis-abhängigen Induktion des Reporter-proteins Gaussia Luciferase. Die Populationen #2 und #3 wiesen im Vergleich zu der Population #1 eine höhere, basale Reportergen-Aktivität auf. Des Weiteren zeigten diese beiden Populationen deutlich höhere Induktionsraten bezüglich der Gaussia Luciferase-Aktivität, was vor allem unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen, aber auch nach Applikation von LiCl deutlich erkennbar war. Als Kontrolle diente eine fuBar-Reportergen-hMSC-Population, bei der ebenfalls Wnt-3a und LiCl in verschiedenen Konzentrationen appliziert wurde. Die Aktivierung des Wnt-Weges führte in dieser Population zu keiner Induktion der Gaussia Luciferase (Abb. E-3G, H).



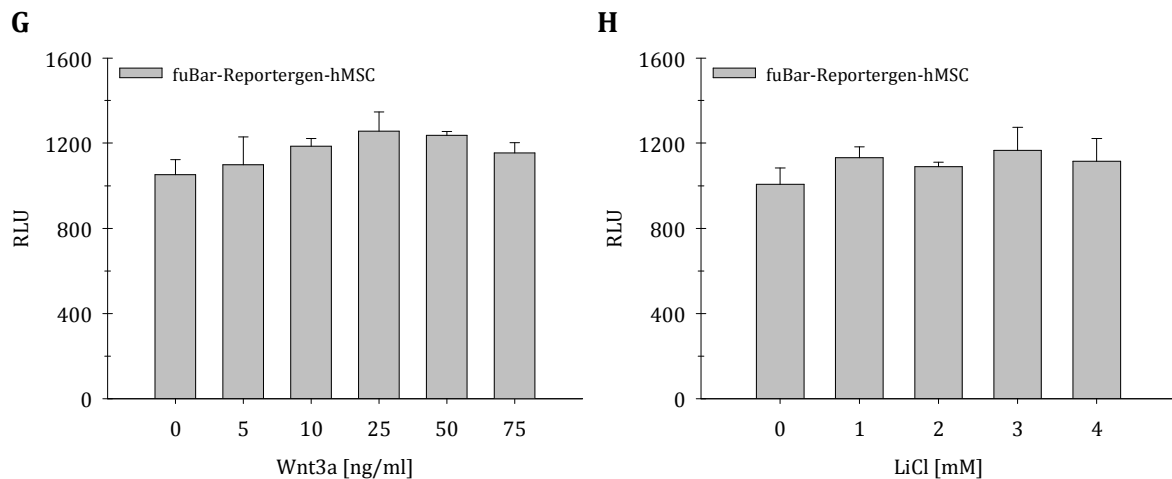


Abb. E-3: Gaussia Luciferase-Aktivität verschiedener TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC-Populationen und einer fuBar-Reporter-gen-hMSC-Population.

hMSC wurden stabil mit dem Plasmid pN3-Bar-Gluc transfiziert, welches über 12 aufeinanderfolgende TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen verfügt. Die erhaltenen TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC-Populationen wurden hinsichtlich der β -Catenin-abhängigen Signaltransduktion mittels Messung der Gaussia Luciferase-Aktivität untersucht. Dazu wurden die ausgewählten Populationen mit fünf verschiedenen Wnt-3a- und LiCl-Konzentrationen stimuliert. Abgebildet ist die Reporter-gen-Aktivität von drei verschiedenen, repräsentativen TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC-Populationen (A-F). Als Kontrolle wurde eine fuBar-Reporter-gen-hMSC-Population untersucht, welche 12 mutierte TCF/LEF-Konsensus-Sequenzen trägt (G, H).

E.1.5 Einfluss der klonalen Expansion von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC

Die Proliferationskapazität der hMSC nimmt mit steigender Passagenzahl ab, bis sie letztendlich stagniert. Um dennoch eine ausreichend hohe Anzahl von hMSC zu erhalten, besteht die Möglichkeit der klonalen Expansion. Hierfür wurde eine ausgewählte Population der TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC (Population #3) nach dem Protokoll für die klonale Expansion unmodifizierter hMSC mit einer Konfluenz von 50 Zellen pro cm^2 ausgesät. Nach 7-10 Tagen war das Einsetzen einer klonalen Expansion beobachtbar. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen wie unter E.1.4 beschrieben zur Überprüfung der Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität ausgesät und mit LiCl bzw. Wnt-3a stimuliert. Dies diente der Analyse, ob die klonale Expansion einen Einfluss auf die Induzierbarkeit des TCF/LEF-Reporter-gen-Systems ausübt. Als Vergleich diente ein Teil dieser TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC-Population, welcher unter normalen Bedingungen weiter expandiert worden war. Es zeigte sich, dass die Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität durch eine klonale Expansion nicht beeinträchtigt wird (Abb. E-4). Auffallend war aber, dass die Aktivität der Gaussia Luciferase nach der klonalen Expansion im basalen Zustand auf das Doppelte anstieg. Die Induktionsraten der Gaussia Luciferase-Aktivität fielen somit unter beiden Expansionsarten vergleichbar aus (1,7-fach mit LiCl und 13,4-17,5-fach mit Wnt-3a).

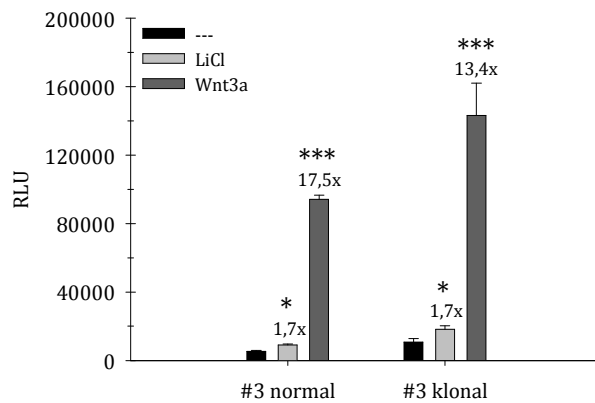


Abb. E-4: Gaussia Luciferase-Aktivität einer unterschiedlich expandierten TCF/LEF-Reportergeren-hMSC-Population.

Die TCF/LEF-Reportergeren-hMSC-Population #3 wurde einerseits normal und andererseits klonal expandiert. Nach Stimulation mit LiCl oder Wnt-3a wurde vergleichend die Gaussia Luciferase-Aktivität bestimmt.

E.1.6 Einfluss der Passage von TCF/LEF-Reportergeren-hMSC

Mit dem Ziel zu analysieren, ob die Passage der TCF/LEF-Reportergeren-hMSC die Aktivität der Gaussia Luciferase beeinflusst, wurde eine ausgewählte hMSC-Population nach dem Auftauen über mehrere Passagen expandiert und die Gaussia Luciferase-Aktivität bestimmt. Der Vergleich der gemessenen Aktivitäten zeigte, dass die Aktivität des Reporterproteins mit steigender Passagenzahl abnimmt (Abb. E-5). Analog dazu nahmen auch die Induktionsraten nach Stimulation mit LiCl von 1,9-fach auf 1,7-fach ab, wohingegen nach Applikation von Wnt-3a eine leichte Zunahme der Induktionsraten, von 14,8-fach auf 17,5-fach, zu verzeichnen war. Insgesamt betrachtet nahm jedoch die absolute Aktivität der Gaussia Luciferase mit steigender Passagenzahl kontinuierlich ab.

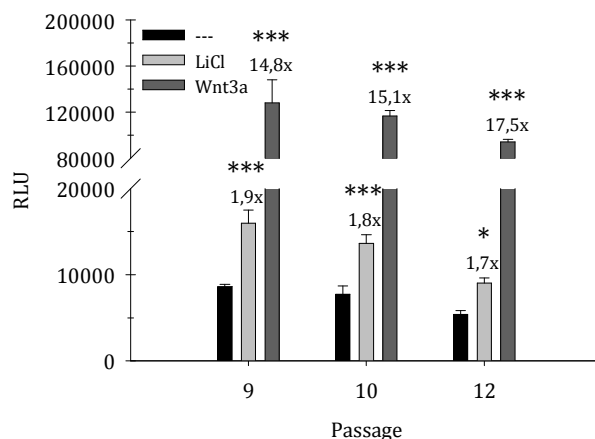


Abb. E-5: Gaussia Luciferase-Aktivität der TCF/LEF-Reportergeren-hMSC-Population #3 in unterschiedlichen Passagen.

Im Rahmen der Expansion der TCF/LEF-Reportergeren-hMSC-Population #3 wurde die Gaussia Luciferase-Aktivität in den angegebenen Passagen unter basalen sowie stimulatorischen Bedingungen (LiCl bzw. Wnt-3a) ermittelt.

E.2 Molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 im Wnt/ β -Catenin-Signalweg

In der Mehrheit der bisherigen LRP-Publikationen wird keine funktionelle Unterscheidung zwischen LRP5 und LRP6 getroffen, obgleich sie nur eine Sequenzhomologie von 70 % aufweisen. Der Knockout jedes Wnt-Korezeptors in Mäusen ist aber mit unterschiedlichen Phänotypen assoziiert (Kato et al., 2002; Kelly et al., 2004), was zu der Annahme beiträgt, dass LRP5 bzw. LRP6 die Funktion des jeweils anderen Rezeptors nicht vollständig übernehmen kann. Basierend auf diesem Hintergrund wurde die molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 in der Wnt/ β -Catenin Signalkaskade von hMSC analysiert.

E.2.1 Basales mRNA- und Protein-Expressionslevel von LRP5 und LRP6

Zunächst wurde untersucht, ob die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 in den vorliegenden hMSC endogen exprimiert werden. Für die Bestimmung des mRNA-Expressionslevels von LRP5 bzw. LRP6 mittels qRT-PCR wurden hMSC in der 5. und 7. Passage verwendet. Die Analyse ergab eine höhere Expression von LRP6 in beiden Passagen im Vergleich zu LRP5 (Abb. E-6A). Ein Unterschied hinsichtlich des Expressionslevels von LRP5 bzw. LRP6 in den beiden analysierten Passagen konnte nicht festgestellt werden. Zur Analyse des endogenen Protein-Expressionslevel der LRPs wurden hMSC nach fünf Tagen Kultivierung mit Maquoi-Lysepuffer aufbereitet. Die Detektion von LRP5 bzw. LRP6 (Abb. E-6B) erfolgte mit dem jeweiligen endogenen Antikörper (Tab. D-11).

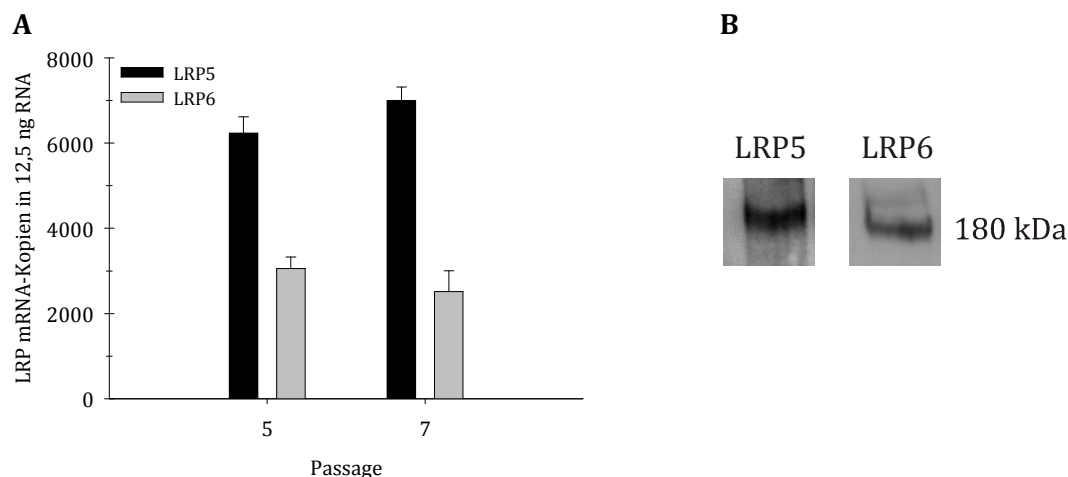


Abb. E-6: mRNA- und Protein-Expressionsprofil von LRP5 und LRP6 in hMSC.

- A) Das endogene mRNA-Expressionslevel der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 in hMSC wurde in zwei verschiedenen Passagen (5 und 7) mittels qRT-PCR bestimmt.
- B) Der semiquantitative Nachweis der endogenen Proteinexpression der LRPs erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung der entsprechenden Antikörper gegen Bereiche der LRP5- bzw. LRP6-Sequenz.

E.2.2 Knockdown-Effizienzen für LRP5, LRP6, β -Catenin und APC

Um einen ersten Einblick in die molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 zu erlangen, sollte die Expression des entsprechenden Wnt-Korezeptors reduziert werden. Dafür kam die RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie zum Einsatz, wobei zuerst die verschiedenen Knockdown-Effizienzen ermittelt wurden. Hierzu wurden hMSC mit der jeweiligen siRNA transfiziert und das entsprechende mRNA-Level über den Zeitraum einer Woche mittels qRT-PCR bestimmt. Für LRP5 und LRP6 ergaben sich vergleichbare Knockdown-Effizienzen (Abb. E-7A und Abb. E-7B). Des Weiteren wurde die Knockdown-Effizienz für β -Catenin (Abb. E-7C) und APC evaluiert (Abb. E-7D), da RNAi gegen β -Catenin bzw. APC eine Kontrolle zur Inhibierung bzw. Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges darstellt.

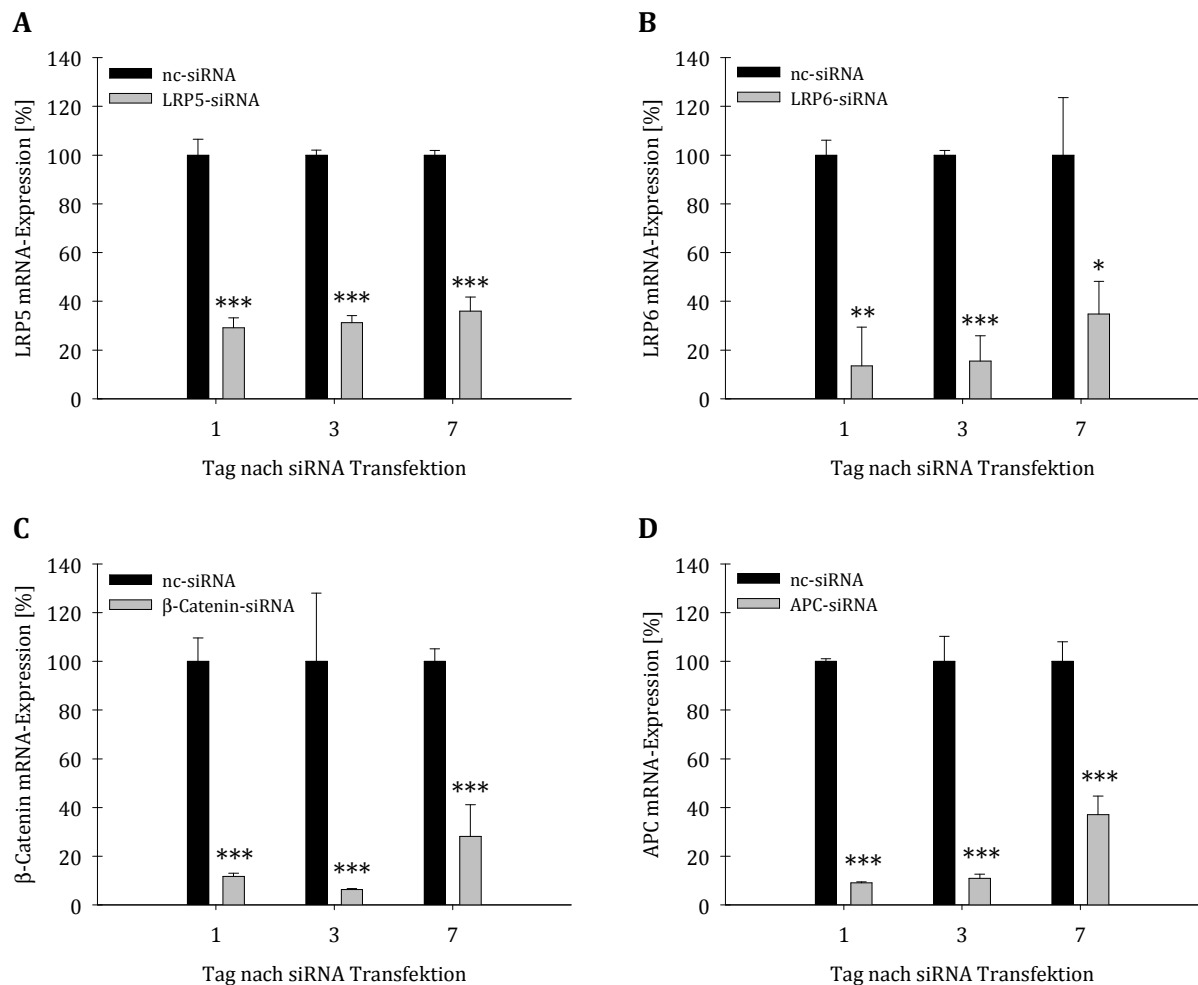


Abb. E-7: Knockdown-Effizienzen der siRNAs gegen LRP5, LRP6, β -Catenin und APC auf mRNA-Ebene.

hMSC wurden mit den entsprechenden siRNAs transfiziert. Mittels qRT-PCR wurde das jeweilige mRNA-Transkriptionslevel an den Tagen 1, 3 und 7 bestimmt und daraus die entsprechende Knockdown-Effizienz errechnet.

- A) Knockdown von LRP5
- B) Knockdown von LRP6
- C) Knockdown von β -Catenin
- D) Knockdown von APC

Zusätzlich zur Analyse der RNAi gegen die verschiedenen Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges auf mRNA-Ebene erfolgte die Bestimmung des Knockdowns auch auf Proteinebene. Dazu wurden hMSC mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und das Proteinlevel mittels Western Blot semiquantitativ ermittelt. In jedem Ansatz wurde zusätzlich das *housekeeping* Gen GAPDH als Kontrolle mitgeführt. Für LRP5 wurde der Knockdown an Tag 7 ermittelt (Abb. E-8A). Der Knockdown von LRP6 wurde im zeitlichen Verlauf an Tag 1, 3, 7 und 11 bestimmt (Abb. E-8B), wobei dieser bereits an Tag 3 deutlich erkennbar war. Für β -Catenin (Abb. E-8C) und APC (Abb. E-8D) ist jeweils der Knockdown an Tag 7 abgebildet.

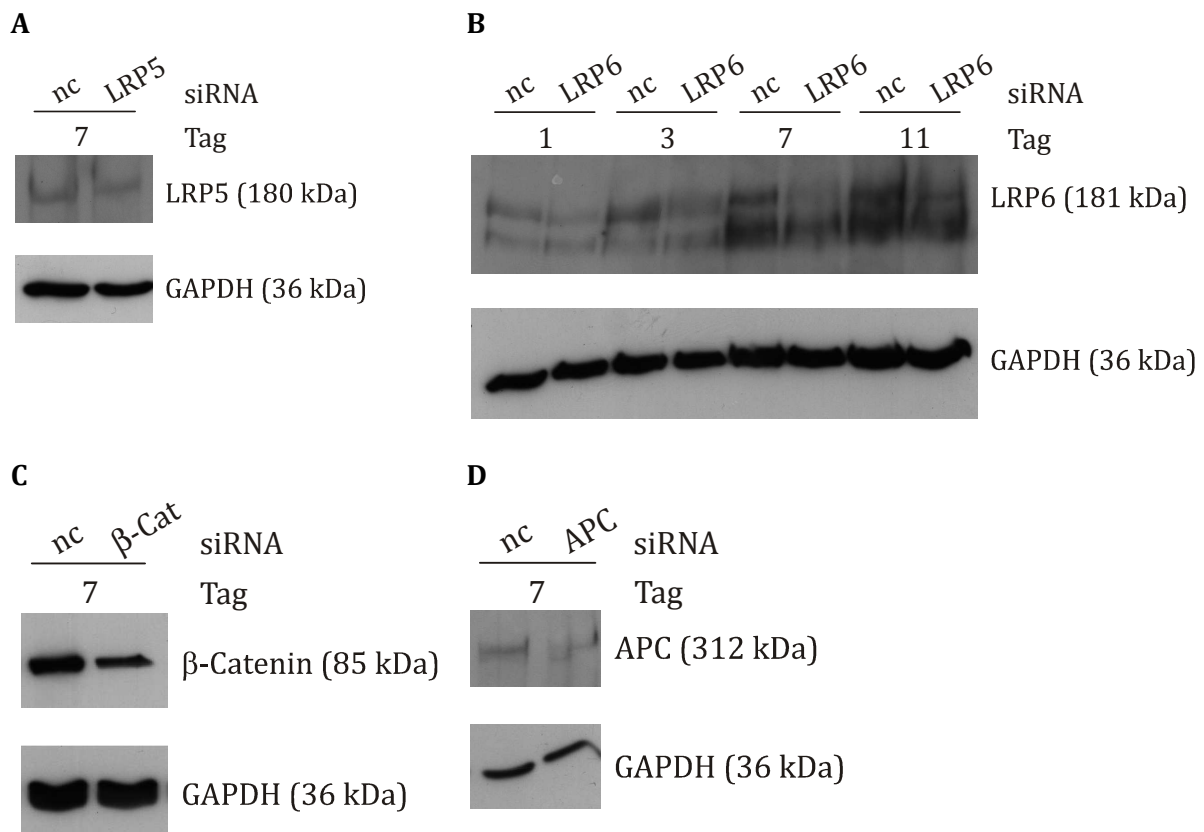


Abb. E-8: Knockdown von LRP5, LRP6, β -Catenin und APC auf Proteinebene.

Nach Transfektion von hMSC mit den entsprechenden siRNAs wurde das Proteinlevel mittels Western Blot semiquantitativ bestimmt. Als Kontrolle wurde zusätzlich das *housekeeping* Gen GAPDH detektiert.

- A) Knockdown von LRP5 an Tag 7
- B) LRP6-Knockdown an Tag 1, 3, 7 und 11
- C) Knockdown von β -Catenin an Tag 7
- D) APC-Knockdown an Tag 7

E.2.3 Einfluss des Knockdowns von LRP5, LRP6, β -Catenin und APC auf die Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion

Die Auswirkung der RNAi gegen LRP5 und LRP6 wurde im Vergleich zum Knockdown von β -Catenin und APC untersucht. Dazu wurden TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und die β -Catenin-vermittelte Gaussia Luciferase-

Aktivität an Tag 7 im Vergleich zu nc-siRNA transfizierten TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC (Kontrolle) gemessen.

Unter basalen Bedingungen (Abb. E-9A) führte der Knockdown von LRP5 und LRP6 lediglich zu einer leichten Abnahme der Signaltransduktion (12 % und 16 %). Im Gegensatz dazu resultierte RNAi gegen β -Catenin in einem deutlichen Einbruch in der Gaussia Luciferase-Aktivität (43 %). Nach Knockdown von APC konnte unter basalen Bedingungen eine 122-fach erhöhte Aktivität des Reporterproteins beobachtet werden.

Bei Applikation von Wnt-3a (Abb. E-9B) war nach RNAi gegen LRP5 keine Veränderung der Wnt/ β -Catenin Signaltransduktion zu beobachten, wohingegen der Knockdown von LRP6 zu einer starken Abnahme (84 %) der Gaussia Luciferase-Aktivität führte. Ein noch stärkerer Einbruch der Signaltransduktion (93 %) resultierte aus dem Knockdown von β -Catenin. RNAi gegen APC führte wie unter basalen Bedingungen zu einer gesteigerten Signaltransduktion (9-fach).

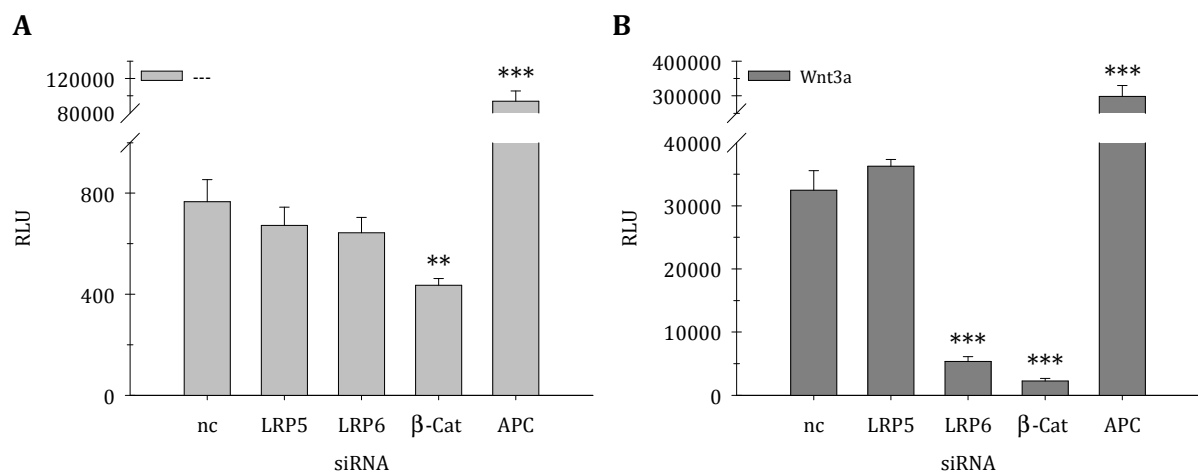


Abb. E-9: Gaussia Luciferase-Aktivität nach RNAi gegen LRP5, LRP6, β -Catenin und APC.

TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC wurden mit den entsprechenden siRNAs gegen LRP5, LRP6, β -Catenin und APC transfiziert. An Tag 7 nach Transfektion wurde die Aktivität des Reporterproteins bestimmt.

A) Basale Bedingungen

B) Wnt-3a-stimulatorische Bedingungen

E.2.4 Einfluss des Knockdowns von LRP5, LRP6, β -Catenin und APC auf das Wnt-Zielgen Axin2

Weiterhin wurde analysiert, welchen Einfluss der Knockdown dieser Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges auf das Wnt-Zielgen Axin2 ausübt. Dazu wurden hMSC mit den entsprechenden siRNAs transfiziert und die mRNA-Expression von Axin2 im Vergleich zu nc-siRNA transfizierten hMSC (Kontrolle) an Tag 6 mittels qRT-PCR ermittelt. Für die Evaluierung unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen wurde dem Kultivierungsmedium ab Tag 5 für 24 Stunden Wnt-3a zugesetzt.

Unter basalen Bedingungen (Abb. E-10A) war nach Knockdown von LRP5 bzw. LRP6 eine vergleichbare Abnahme der Axin2-Expression von 35 % bzw. 32 % zu verzeichnen. Der Knockdown von β -Catenin führte zu einer Reduktion des Axin2-mRNA-Trans-

kriptionslevels um 50 %. Im Gegensatz dazu resultierte RNAi gegen APC in einer 13-fach gesteigerten Expression von Axin2.

Nach Applikation von Wnt-3a (Abb. E-10B) zeigte RNAi gegen LRP5 keinen Einfluss auf das Wnt-Zielgen Axin2, während der Knockdown von LRP6 mit einer Reduktion der Axin2-Expression um 45 % assoziiert war. RNAi gegen β -Catenin führte im Vergleich zu einer stärkeren Abnahme (62 %) des Axin2 mRNA-Expressionslevels. Der Knockdown von APC resultierte in einer 4-fach gesteigerten Expression von Axin2 unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen.

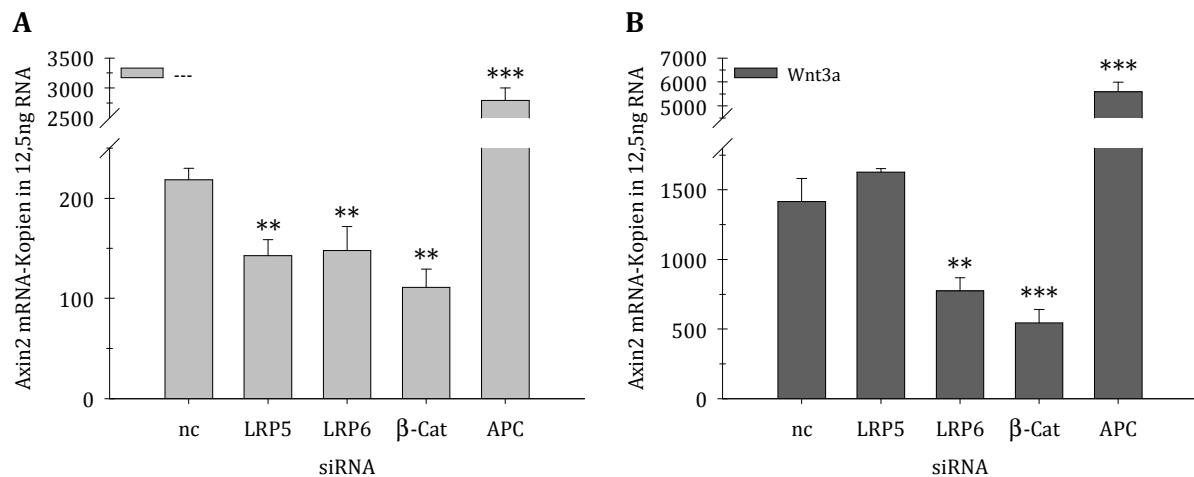


Abb. E-10: Axin2 mRNA-Expression nach RNAi gegen LRP5, LRP6, β -Catenin und APC.

hMSC wurden mit den entsprechenden siRNAs gegen LRP5, LRP6, β -Catenin und APC transfiziert. An Tag 6 nach Transfektion wurde das mRNA-Expressionslevel von Axin2 bestimmt.

A) Basale Bedingungen

B) 24 Stunden Wnt-3a-stimulatorische Bedingungen

E.2.5 Klonierung von LRP6

Nachdem RNAi gegen die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 einen beachtlichen Unterschied in der β -Catenin-vermittelten Signalweiterleitung wie auch in der Regulation des Wnt-Zielgens Axin2 aufzeigte, sollte überprüft werden, ob eine Überexpression von LRP5 bzw. LRP6 zu gegensätzlichen Effekten führen würde. Die CDS von LRP5 lag bereits im Expressionsvektor pN3-Mock vor. Zum direkten Vergleich war es daher nötig, die CDS von LRP6 ebenfalls in den Expressionsvektor pN3-Mock einzubringen.

Die ursprüngliche Strategie, die LRP6-CDS mit einer Länge von 4842 bp in einem Stück mittels PCR aus HEK-293-cDNA zu amplifizieren, blieb ohne Erfolg. Aus diesem Grund wurde die CDS von LRP6 für die Amplifikation in drei Fragmente (F1, F2, F3) unterteilt (Abb. E-11).

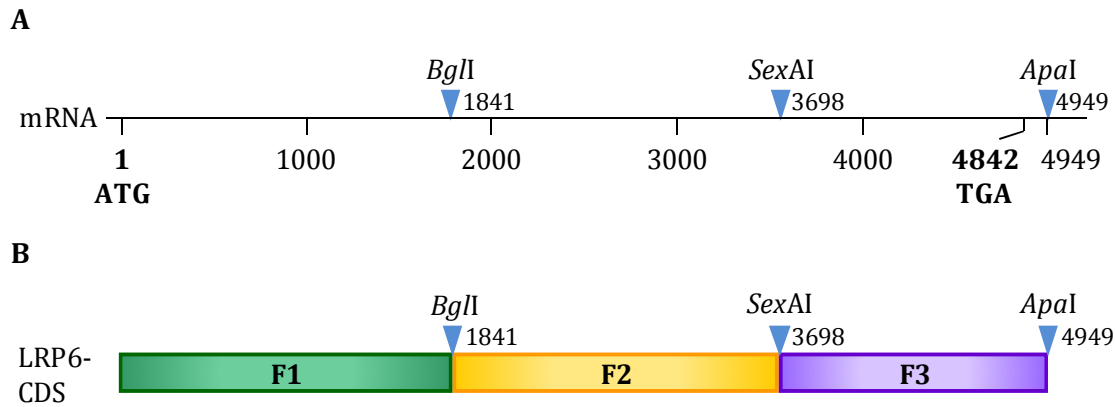


Abb. E-11: Schematische Darstellung der LRP6-Klonierung.

Für die Klonierung der CDS des Wnt-Korezeptors LRP6 wurde die mRNA (A) in drei Fragmente (F1, F2, F3) (B) unterteilt, aus denen die LRP6-CDS über die ausgewählten Restriktionsschnittstellen zusammengefügt und in den Zielvektor ligiert wurde.

Die Fragmente F1 und F2 wurden aus HEK-293-cDNA amplifiziert. Für das Fragment F3 diente der Vektor pFlag-CMV1-LRP6 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Stuart Aaronson; Mount Sinai School of Medicine; New York, USA) als PCR-Matrize. Jedes Fragment wurde mit der Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase unter jeweils für die Fragmentgröße optimalen PCR-Bedingungen amplifiziert, wobei die Primer am jeweiligen 5'-Ende mit der entsprechenden Restriktionsschnittstelle (Tab. D-1) für die nachfolgenden Klonierungsschritte versehen waren. Für die TOPO-TA Klonierung der einzelnen Fragmente in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor (Abb. D-1) wurde ein PCR-Schritt mit der *Taq*-Polymerase angeschlossen, wodurch die notwendigen 3'-überhängenden Desoxyadenosin-Moleküle angehängt wurden. Zur Verifizierung der jeweiligen Fragmentgröße wurden die PCR-Ansätze in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. E-12) und die Fragmente nach erfolgter Elution aus dem Gel jeweils in den Vektor pCR®2.1-TOPO® ligiert (Abb. E-13A).

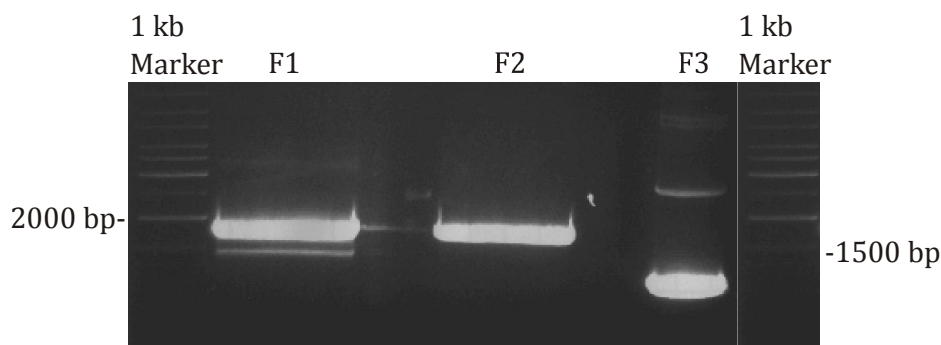


Abb. E-12: LRP6-Fragmente nach PCR-Amplifikation im 1 %igen Agarosegel.

Die LRP6-Fragmente F1, F2 und F3 wurden mit der Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase amplifiziert und zur Verifizierung der Größe mit anschließender Gelelution in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Nach Verifizierung der Richtigkeit der Sequenzen wurde zunächst das Fragment F3 über die Restriktionsschnittstellen *Sex*AI und *Not*I in den Vektor pCR®2.1-TOPO®-F2

eingbracht, um den Vektor pCR®2.1-TOPO®-F2-F3 (Abb. E-13B) zu generieren. Anschließend wurde das entstandene Fragment F2-F3 durch Restriktion des Vektors pCR®2.1-TOPO®-F2-F3 mit *Bgl*I und *Apa*I isoliert. Das Fragment F1 wurde mittels Restriktion des Vektors pCR®2.1-TOPO®-F1 mit *Bam*HI und *Bgl*I gewonnen. Der Expressionsvektor pN3-Mock (Abb. D-4) wurde mit den RE *Bam*HI und *Apa*I für die Ligation vorbereitet. Zum Abschluss wurden der präparierte Vektor pN3, das Fragment F1 und das Fragment F2-F3 in einer trimolekularen Reaktion im Verhältnis 1:1:1 miteinander ligiert, woraus der Expressionsvektor pN3-LRP6 hervorging (Abb. E-13C).

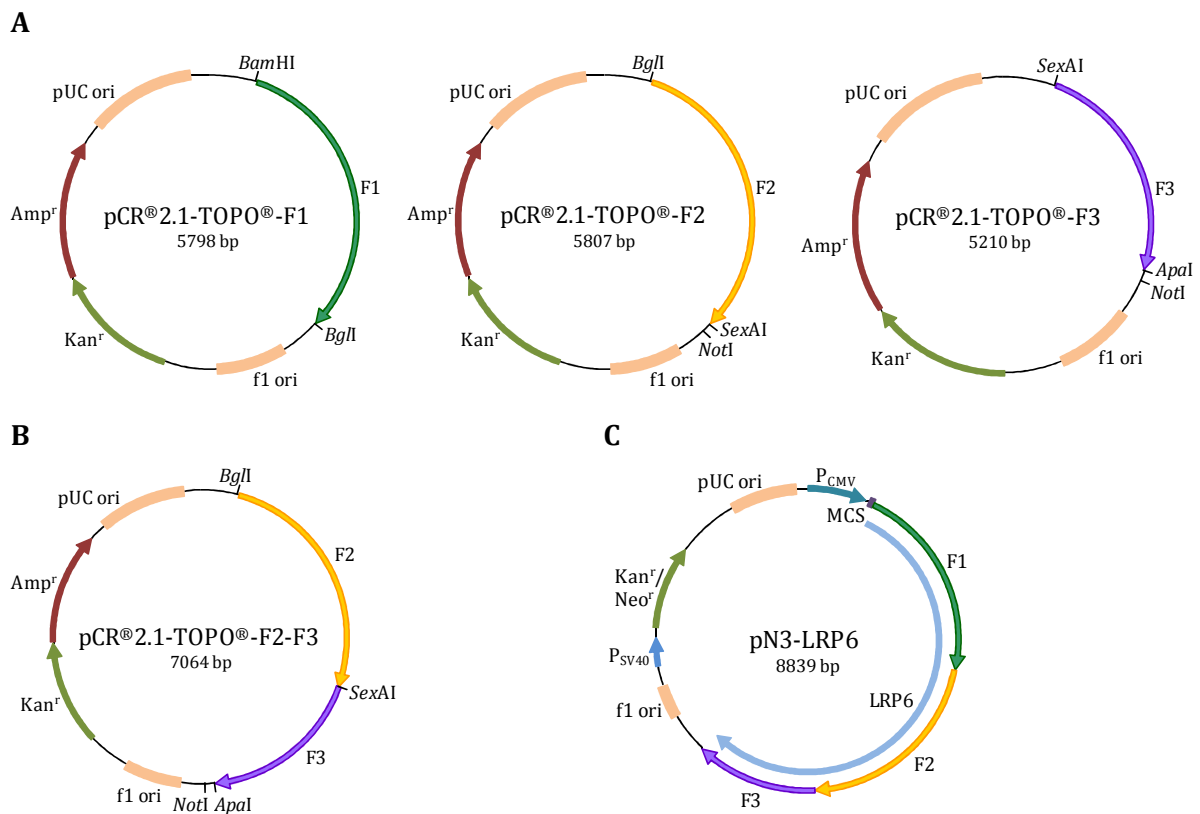


Abb. E-13: Schematische Darstellung der Klonierung von pN3-LRP6.

- A) Die mittels PCR amplifizierte Fragmente F1, F2 und F3 wurden jeweils in den Vektor pCR®2.1-TOPO® ligiert.
- B) Durch Ligation des Fragmentes F3 in den Vektor pCR®2.1-TOPO®-F2 entstand die Kombination von F2 und F3.
- C) Plasmidkarte des generierten Expressionsvektors pN3-LRP6.
P_{CMV}: früher Promotor des humanen Cytomegalievirus; MCS: multiple Klonierungsstelle; LRP6: CDS von LRP6; F1, F2, F3: LRP6-Fragmente; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

E.2.6 Überexpression von LRP5 und LRP6 auf mRNA-Ebene

Der auf diese Weise generierte Vektor pN3-LRP6, der Vektor pN3-LRP5 und der Kontrollvektor pN3-Mock wurden transient in hMSC transfiziert und die Überexpression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bestimmt. Für LRP5 (Abb. E-14A) ergab sich an Tag 1 eine 80-fache und an Tag 3 eine 3-fache Überexpression auf mRNA-Ebene. LRP6 (Abb. E-14B) wurde an Tag 1 32-fach und an Tag 3 5-fach überexprimiert.

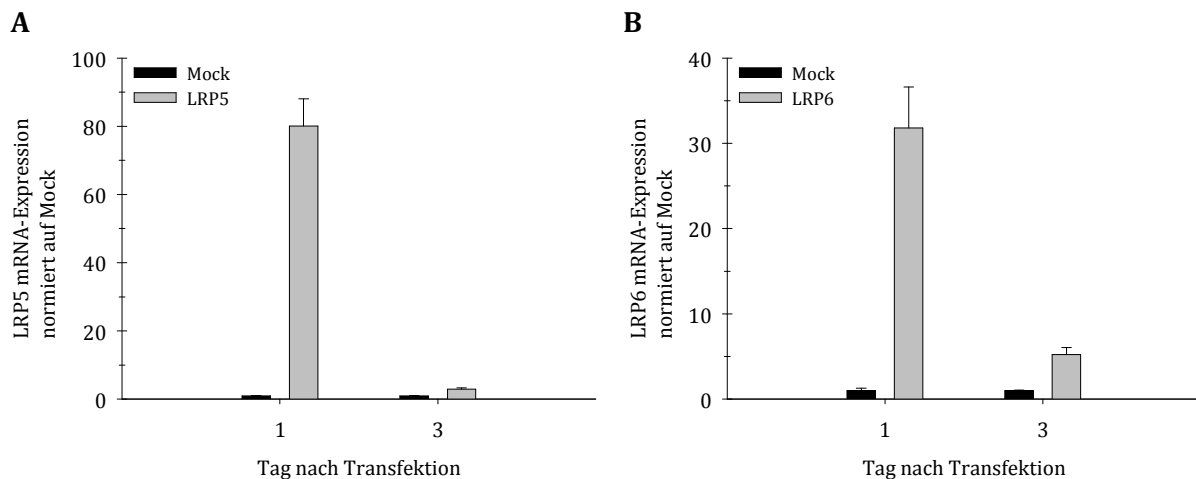


Abb. E-14: Überexpression von LRP5 und LRP6 auf mRNA-Ebene.

hMSC wurden transient mit pN3-Mock (Kontrolle; auf 1 gesetzt) und pN3-LRP5 (A) oder pN3-LRP6 (B) transfiziert. An Tag 1 und 3 nach Transfektion wurde mittels qRT-PCR die Überexpression der Wnt-Korezeptoren ermittelt.

E.2.7 Einführung von tag-Sequenzen in die Wnt-Korezeptoren

Zur Erleichterung der spezifischen Detektion der Wnt-Korezeptoren auf Proteinebene wurden am N- bzw. C-Terminus von LRP5 und LRP6 unterschiedliche *tag*-Sequenzen eingeführt (Flag bei LRP5; Hämagglutinin (HA) bei LRP6) (Abb. E-15).

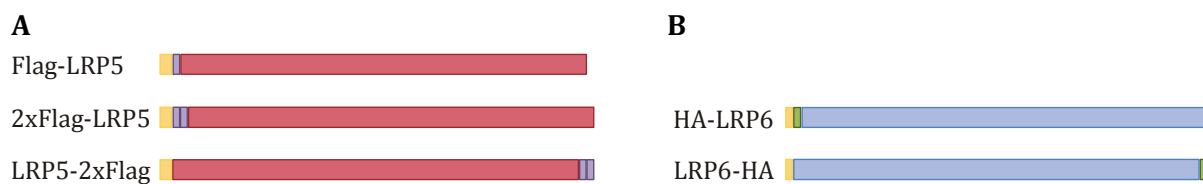


Abb. E-15: Schematische Darstellung der getaggen Wnt-Korezeptoren.

Abgebildet sind die getaggen Varianten der Wnt-Korezeptoren LRP5 (A) bzw. LRP6 (B) mit Signalpeptid (gelb), Flag-*tag* Sequenz (lila), HA-*tag* Sequenz (grün), CDS von LRP5 (rot) bzw. CDS von LRP6 (blau).

Um eine geeignete Insertionsstelle am N-Terminus zu definieren, wurde die Aminosäuresequenz des jeweiligen Wnt-Korezeptors unter Zuhilfenahme von SignalP (D.1.2) hinsichtlich der Spaltstellen nach dem Signalpeptid analysiert. Anhand der erhaltenen Spaltungsmuster wurde eine jeweils geeignete Strategie zur Einbringung des vorgesehenen *tags* erarbeitet. Die Insertion am C-Terminus erfolgte in beiden Fällen so nah wie möglich vor dem Stopcodon, um mögliche Einflüsse auf die intrazelluläre Domänenstruktur zu minimieren.

Für die Einführung des N-terminalen *tags* in LRP5 und des C-terminalen *tags* in LRP6 wurden entsprechende Oligonukleotide von der Fa. Metabion synthetisiert, die über singuläre Restriktionsschnittstellen eingeführt werden sollten. Dazu wurden die jeweiligen Oligonukleotide (Top und Bottom) miteinander hybridisiert und anschließend einer Phosphorylierungsreaktion unterzogen. Da LRP5 an der entsprechenden Stelle im N-Terminus nur *SacII* als geeignete Insertionsstelle aufwies, diese Schnittstelle aber

auch in der MCS des pN3-Rückgrates vorlag, musste diese aus der MCS entfernt werden. Aufgrund mangelnder, verfügbarer Restriktionsschnittstellen in pN3-LRP5 konnte die *SacII*-Schnittstelle nicht direkt entfernt werden. Daher war es nötig, zuerst den Vektor pN3-Mock mit *HindIII* und *XbaI* zu restringieren, um die *SacII*-Schnittstelle zu entfernen und den linearisierten Vektor pN3-Mock Δ *SacII* zu erhalten. pN3-LRP5 wurde ebenfalls mit diesen Enzymen geschnitten und die somit gewonnene CDS von LRP5 in den linearisierten Vektor pN3-Mock Δ *SacII* ligiert, um wiederum pN3-LRP5 zu erhalten. Nach Linearisierung des erhaltenen Vektors pN3-LRP5 mit *SacII* und pN3-LRP6 mit *BsrGI* wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt, um die Religationswahrscheinlichkeit der Vektoren zu minimieren. Die dephosphorylierten Vektoren und die hybridisierten, phosphorylierten Oligonukleotide wurden im molaren Verhältnis 1:5 ligiert, wodurch die Vektoren pN3-Flag-LRP5 (Abb. E-16A), pN3-2xFlag-LRP5 (Abb. E-16B) und pN3-LRP6-HA (Abb. E-16E) entstanden.

Die C-terminal getaggte Variante von LRP5 wurde mit dem 2xFlag-*tag* generiert, da dieser vom entsprechenden anti-Flag Antikörper bei den N-terminalen Varianten besser detektiert werden konnte (siehe E.2.8). Um den C-terminalen *tag* in LRP5 und den N-terminalen *tag* in LRP6 zu inserieren, wurden von der Fa. GeneArt die entsprechenden synthetischen Konstrukte pMK-RQ-LRP5-2xFlag (Abb. D-2) und pMA-HA-LRP6 (Abb. D-3) bezogen, die einen definierten Anteil des jeweiligen Wnt-Korezeptor-Gens mit eingefügter *tag*-Sequenz und unterschiedliche Restriktionsschnittstellen enthielten. Zur Klonierung von pN3-LRP5-2xFlag (Abb. E-16C) wurde zuerst eine Linearisierung des Vektors pMK-RQ-LRP5-2xFlag mit *XbaI* und des Zielvektors pN3-LRP5 mit *XhoI* durchgeführt und die entstehenden überhängenden Enden mittels des Klenow-Enzyms aufgefüllt, um glatte Enden zu generieren. Anschließend wurden die beiden linearisierten Vektoren mit *BsrGI* geschnitten und die dem Vektor und Insert entsprechenden Fragmente im molaren Verhältnis 1:3 ligiert. Für die Klonierung von pN3-HA-LRP6 (Abb. E-16D) wurde das LRP6-Genfragment mit enthaltenem HA-*tag* mit den RE *BamHI* und *BsmI* aus dem Vektor pMA-HA-LRP6 geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen präparierten Vektor pN3-LRP6 eingefügt, wobei für die Ligation ebenfalls ein molares Vektor zu Insert Verhältnis von 1:3 gewählt wurde.

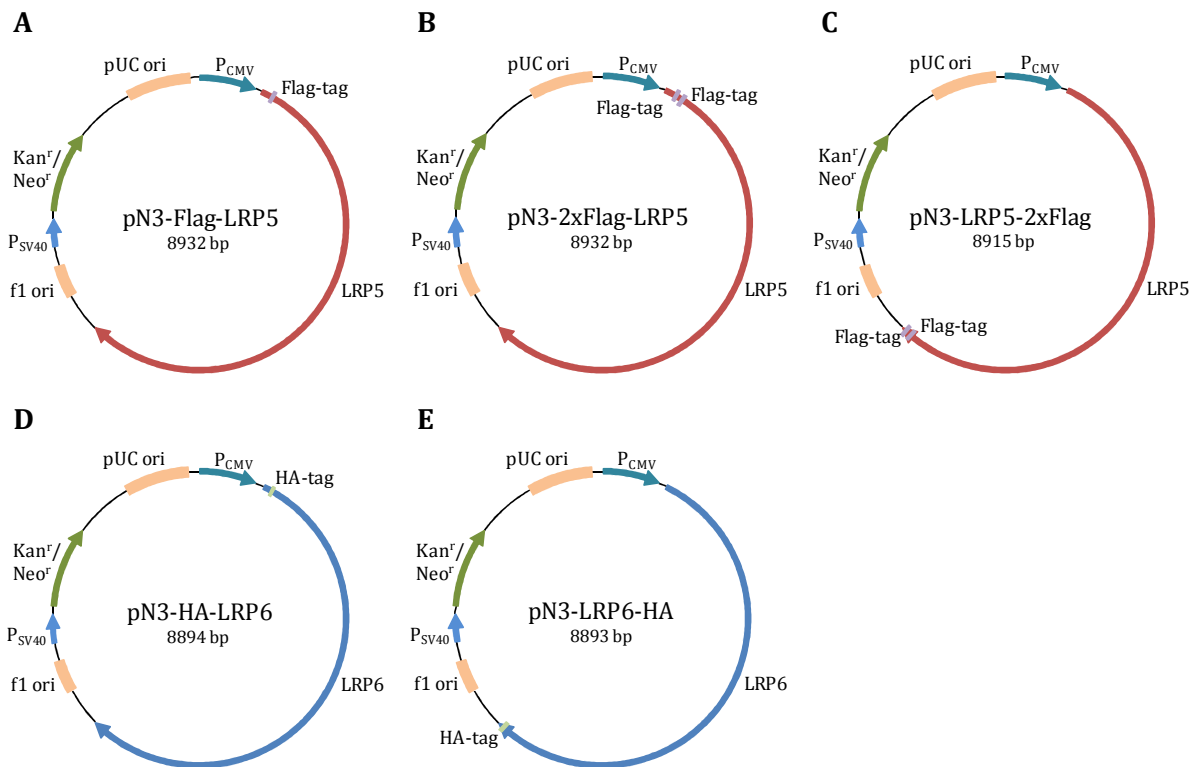


Abb. E-16: Plasmidkarten der getaggten LRP-Expressionsvektoren.

Einheitliche Komponenten: P_{CMV}: früher Promotor des humanen Cytomegalievirus; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

A), B) und C) Flag-getaggte Varianten von LRP5

D) und E) HA-getaggte Varianten von LRP6

E.2.8 Überexpression von LRP5 und LRP6 auf Proteinebene

Zum Nachweis der Überexpression der Wnt-Korezeptoren auf Proteinebene wurde zuerst ein *proof of principle* Ansatz mit HEK-293 durchgeführt. Hierfür wurden HEK-293 mit den getaggten Varianten von LRP5 und LRP6 transfiziert und an Tag 2 nach Transfektion mit dem Lysepuffer nach Leeb-Lundberg lysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte im Fall von LRP5 mit einem gegen die LRP5-Sequenz gerichteten und einem Flag-tag spezifischen Antikörper (Tab. D-11). Für LRP6 wurden ein gegen die LRP6-Sequenz gerichteter Antikörper und ein gegen den HA-tag gerichteter Antikörper verwendet (Tab. D-11). Die N-terminal getaggten Varianten von LRP5 konnten mit beiden eingesetzten Antikörpern detektiert werden (Abb. E-17A), wobei die Variante mit dem 2xFlag-tag ein stärkeres Signal zeigte. Der Nachweis von LRP5-2xFlag wurde nur mit dem Flag-tag spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. E-17B). Die beiden getaggten Varianten von LRP6 wurden ebenfalls durch beide Antikörper erkannt (Abb. E-17C).

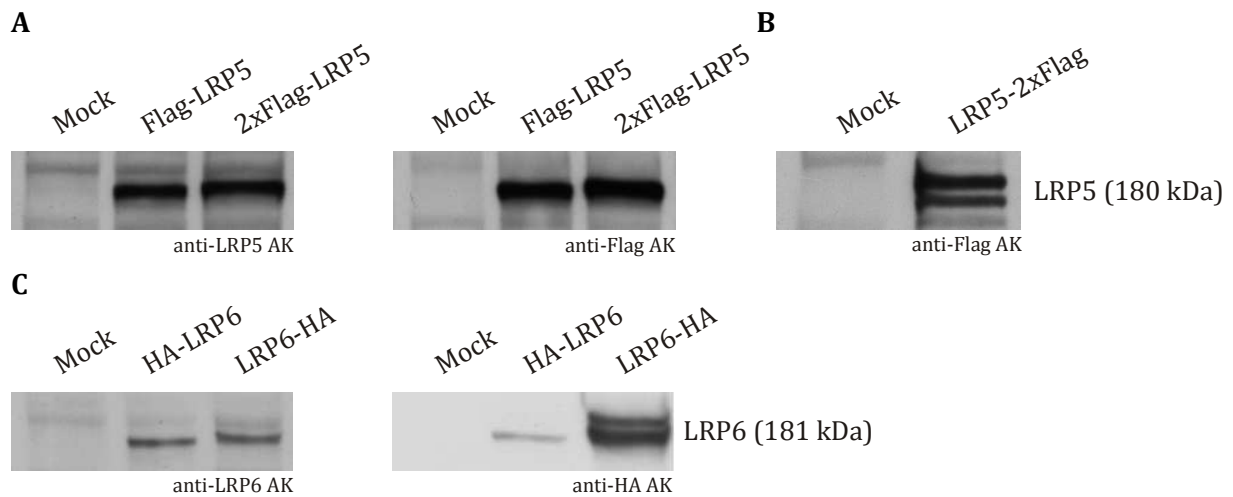


Abb. E-17: Nachweis der Überexpression von LRP5 und LRP6 in HEK-293.

HEK-293 wurden transient mit den getaggten Varianten von LRP5 bzw. LRP6 und der Mock-Kontrolle transfiziert. Am Tag 2 nach Transfektion erfolgte der semiquantitative Nachweis der entsprechenden Proteine mittels Western Blot.

- A) Detektion der N-terminal getaggten Varianten von LRP5
- B) Nachweis der C-terminal getaggten Variante von LRP5
- C) Visualisierung der getaggten Varianten von LRP6

Um den Nachweis der Überexpression von LRP5 und LRP6 in hMSC zu erbringen, wurden hMSC sowohl mit den natürlichen Varianten als auch mit den getaggten Varianten transient transfiziert, wobei die Variante Flag-LRP5 nicht zum Einsatz kam. Nach zwei Tagen Kultivierung erfolgte die Isolierung der Proteine unter Verwendung des Lysepuffers nach Maquoi. Für die Detektion wurden wiederum die endogenen LRP-Antikörper sowie die *tag*-spezifischen Antikörper eingesetzt (Tab. D-11).

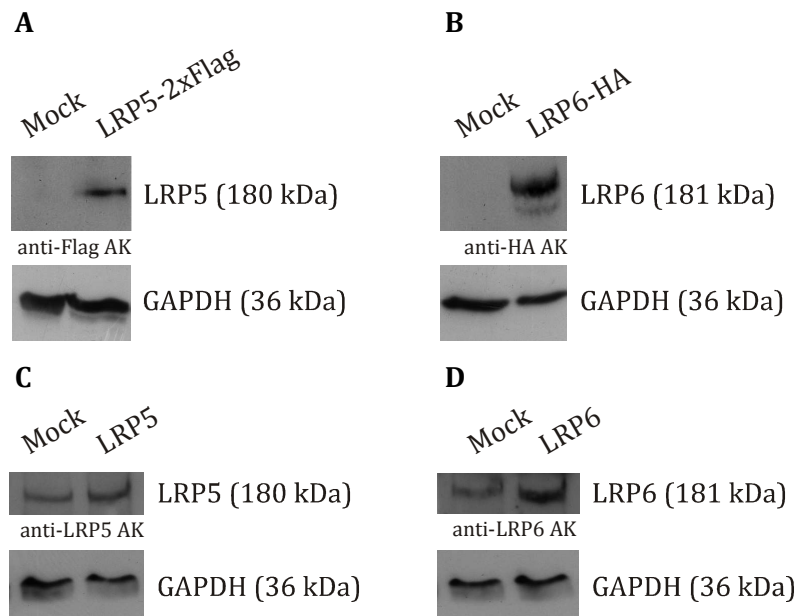


Abb. E-18: Nachweis der Überexpression von LRP5 bzw. LRP6 in hMSC.

Der semiquantitative Nachweis der Wnt-Korezeptoren LRP5 (A, C) bzw. LRP6 (B, D) mittels Western Blot erfolgte zwei Tage nach transienter Transfektion von hMSC mit der entsprechend getaggten oder der natürlichen LRP-Variante und der Mock-Kontrolle. Als Kontrolle wurde jeweils GAPDH detektiert.

- A) und B) Detektion der LRPs unter Verwendung des jeweiligen *tag*-Antikörpers
- C) und D) Nachweis der LRPs mit dem entsprechend endogenen Antikörper

Im Gegensatz zum Nachweis in HEK-293 konnten in hMSC nur die C-terminal getaggten Varianten der LRPs detektiert werden (Abb. E-18A, B), jedoch nicht die N-terminal getaggten. Beide Wnt-Korezeptoren waren außerdem mit dem jeweils endogenen Antikörper visualisierbar (Abb. E-18C, D). Als Ladekontrolle wurde außerdem GAPDH detektiert.

E.2.9 Einfluss der Überexpression der Wnt-Korezeptoren auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg

Zur Untersuchung des Einflusses von überexprimiertem LRP5 bzw. LRP6 auf den Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweg wurden hMSC transient mit pN3-LRP5 oder pN3-LRP6 sowie dem Kontrollplasmid pN3-Mock zusammen mit dem Reportergen-Plasmid pN3-Bar-Gluc kotransfiziert. Die Aktivität der Gaussia Luciferase wurde unter basalen sowie unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen ermittelt. Unter basalen Konditionen wies die Überexpression der Wnt-Korezeptoren keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zu Kontroll-transfizierten hMSC auf (Abb. E-19). Erst durch die Applikation von Wnt-3a war eine deutliche Veränderung in der Signalweiterleitung messbar. Während die Überexpression von LRP5 unter Wnt-3a-Stimulation nur einen geringen Einfluss zeigte (1,4-fache Erhöhung), führte überexprimiertes LRP6 zu einer starken Erhöhung (6,3-fach) der Gaussia Luciferase-Aktivität (Abb. E-19).

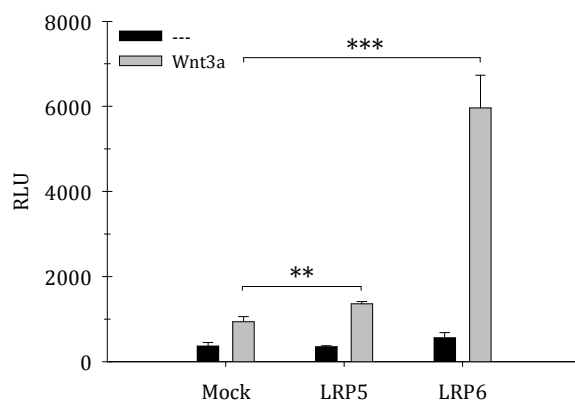


Abb. E-19: Gaussia Luciferase-Aktivität nach Überexpression von LRP5 und LRP6.

Die Aktivität der Gaussia Luciferase wurde nach transienter Transfektion von hMSC mit pN3-Mock (Kontrolle), pN3-LRP5 oder pN3-LRP6 sowohl unter basalen als auch Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen ermittelt.

E.2.10 Einfluss der Überexpression der Wnt-Korezeptoren auf das Wnt-Zielgen Axin2

Des Weiteren wurde die Auswirkung der LRP-Überexpression auf das Wnt-Zielgen Axin2 analysiert. Hierfür wurden hMSC mit den LRP-Überexpressionsplasmiden pN3-LRP5 bzw. pN3-LRP6 sowie der Kontrolle pN3-Mock transient transfiziert und das mRNA-Transkriptionslevel von Axin2 an Tag 5 mittels qRT-PCR evaluiert. Zur Analyse der Effekte unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen wurde das Kultivierungsmedium ab Tag 4 für 24 Stunden mit Wnt-3a versetzt. Während die Überexpression von

LRP5 unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die Axin2 mRNA-Expression ausübte, resultierte die Überexpression von LRP6 in einem erhöhten Axin2-Transkriptionslevel (Abb. E-20). Unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen (Abb. E-20) zeigte sich nach LRP5-Überexpression eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme der Axin2-mRNA. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von LRP6 nach Applikation von Wnt-3a zu einer deutlich vermehrten Expression von Axin2 auf mRNA-Ebene.

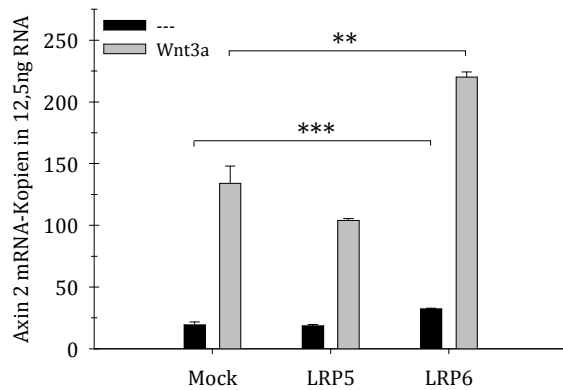


Abb. E-20: Axin2 mRNA-Transkriptionslevel nach Überexpression von LRP5 und LRP6.

Das mRNA-Transkriptionslevel von Axin2 wurde fünf Tage nach transients Transfektion von hMSC mit pN3-Mock (Kontrolle), pN3-LRP5 oder pN3-LRP6 unter basalen sowie Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen mittels qRT-PCR bestimmt.

E.2.11 Rescue der LRP6-vermittelten Signaltransduktion

Basierend auf den Ergebnissen, dass der Knockdown von LRP6 zu einer starken Abnahme der Wnt/ β -Catenin Signaltransduktion führte, wohingegen die Überexpression von LRP6 die Signalaktivität steigerte, sollte weiterführend untersucht werden, ob sich die LRP6-vermittelte Signaltransduktion in LRP6 Knockdown-hMSC wiederherstellen lässt. Zu diesem Zweck wurde der Knockdown von endogen exprimiertem LRP6 mit einer 3'-UTR-siRNA durchgeführt. Die Knockdown-Effizienz wurde auf mRNA-Ebene über den Zeitraum einer Woche bestimmt und belief sich auf 66-72 % (Abb. E-21).

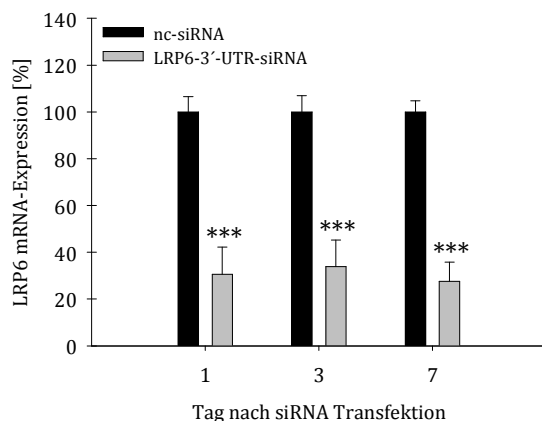


Abb. E-21: Knockdown-Effizienz der LRP6-3'-UTR-siRNA.

An Tag 1, 3 und 7 nach transients Transfektion von hMSC mit nc-siRNA und einer siRNA gegen den 3'-UTR von LRP6 wurde die Knockdown-Effizienz mit Hilfe einer qRT-PCR bestimmt.

Für das Rescue-Experiment an sich (zeitlicher Verlauf siehe Abb. E-22A) wurde RNAi gegen LRP6 in hMSC zunächst mit der 3'-UTR-siRNA induziert. Fünf Tage später wurden diese LRP6 Knockdown-hMSC mit dem TCF/LEF-Reporter-Gen-Plasmid und entweder mit der CDS von LRP6 (pN3-LRP6) bzw. LRP5 (pN3-LRP5) oder mit dem entsprechenden Kontroll-Vektor (pN3-Mock) kotransfiziert. Die Auswirkungen auf die Wnt/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion wurden sowohl unter basalen als auch unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen analysiert (Abb. E-22B). RNAi gegen LRP6 resultierte nach Wnt-3a-Applikation in einer Abnahme der Gaussia Luciferase-Aktivität um 28 %. Nach Knockdown von endogenem LRP6 mit darauffolgender Überexpression der CDS von LRP6 war ein 2,5-facher Anstieg der Signalaktivität unter Wnt-3a-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression der CDS von LRP5 zu keiner nachhaltigen Veränderung der Gaussia Luciferase-Aktivität. Somit konnte die Wnt/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion nach Knockdown des endogenen LRP6 nur durch überexprimiertes LRP6 – nicht aber durch LRP5 – wiederhergestellt werden.

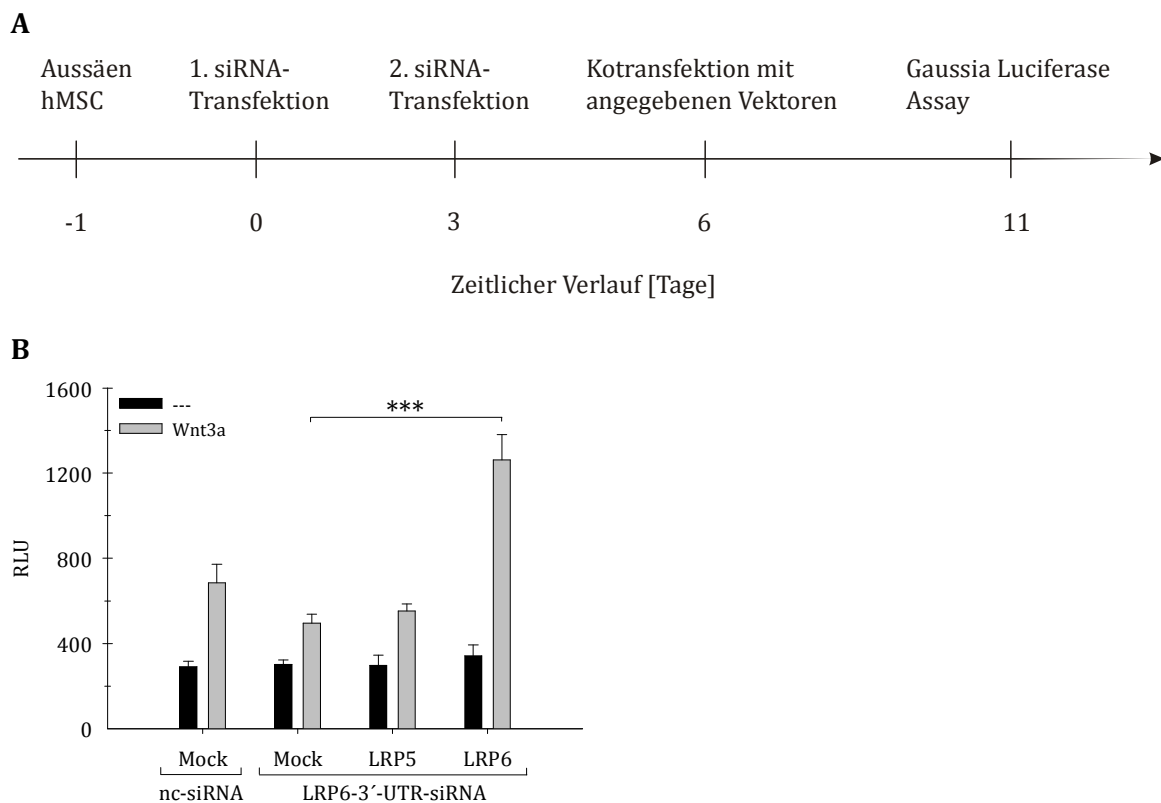


Abb. E-22: Gaussia Luciferase-Aktivität nach Rescue der LRP6-vermittelten Signaltransduktion.

Für den Knockdown von endogen exprimiertem LRP6 wurden hMSC mit einer LRP6-3'-UTR-siRNA transfiziert. Fünf Tage danach wurden diese hMSC mit dem TCF/LEF-Reporter-Gen-Plasmid pN3-Bar und pN3-Mock (Kontrolle), pN3-LRP5 oder pN3-LRP6 kotransfiziert.

A) Zeitlicher Verlauf des Rescue-Experiments.

B) Die Aktivität der Gaussia Luciferase wurde unter basalen Bedingungen sowie nach Applikation von Wnt-3a bestimmt.

E.3 Analyse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in stabil LRP-exprimierenden hMSC

Aufgrund der Schwierigkeit nachhaltige Einflüsse einer Überexpression der Wnt-Korezeptoren mittels eines transienten Ansatzes zu bestimmen, sollten hMSC generiert werden, die entweder LRP5 oder LRP6 stabil exprimieren. Hierfür wurde einerseits eine randomisierte und andererseits eine ortsspezifische Integration von Plasmid-DNA in die gDNA von hMSC durchgeführt.

E.3.1 Generierung stabil transfizierter hMSC mittels randomisierter Integration

Bei einer randomisierten Integration in die gDNA wird die episomal vorliegende Plasmid-DNA an einer zufälligen Position geöffnet und in das Genom der Zelle integriert. Dadurch kann es vorkommen, dass die Zellen das gewünschte Plasmid tragen, jedoch das Transgen nicht exprimieren. Somit ist es unerlässlich, die erhaltenen hMSC-Populationen hinsichtlich der Transgen-Expression zu analysieren.

E.3.1.1 Stabile Transfektion von hMSC mit Mock, LRP5 und LRP6

Für die Generierung stabiler hMSC wurden diese in der 4. Passage mit pN3-Mock, pN3-LRP5, pN3-LRP6 oder versuchsweise mit pN3-HA-LRP6 transfiziert. Zur Selektion von stabil transfizierten Zellen wurde dem Kultivierungsmedium zwei Tage nach Transfektion Geneticin zugesetzt, wobei die Ausbeute generell sehr niedrig ausfiel. Die stabil transfizierten hMSC wurden unter Selektionsdruck für weitere Analysen bis in die 7. Oder 8. Passage expandiert.

E.3.1.2 Expressionslevel der LRPs in stabil transfizierten hMSC auf mRNA-Ebene

Die so erhaltenen, stabil transfizierten hMSC wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich des mRNA-Expressionslevels des jeweiligen Wnt-Korezeptors analysiert.

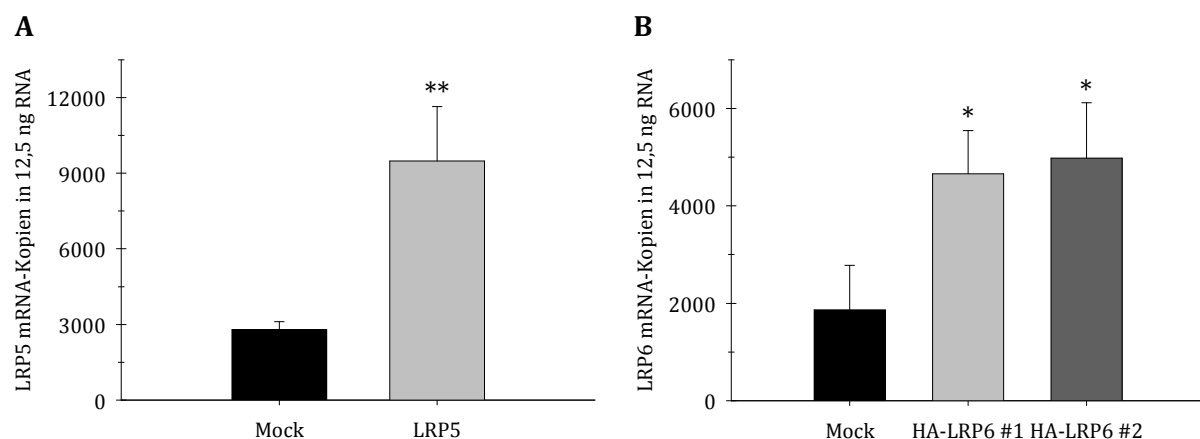


Abb. E-23: Expressionslevel von LRP5 bzw. LRP6 in stabilen hMSC-Populationen.

hMSC wurden stabil mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und das Expressionslevel der LRPs im Vergleich zu pN3-Mock (Kontrolle) mittels qRT-PCR evaluiert.
LRP-Expressionslevel in LRP5-hMSC (A) und LRP6-hMSC (B)

Für LRP5 wurde eine stabile hMSC-Population erhalten, die eine 3,4-fache Überexpression von LRP5 im Vergleich zur Mock-Kontrolle aufwies (Abb. E-23A). Die Transfektion von pN3-LRP6 blieb erfolglos, da die transfizierten hMSC vor Erreichen einer genügend hohen Zellzahl das Wachstum einstellten. Mit pN3-HA-LRP6 konnten zwei Populationen mit geringer Zellzahl generiert werden, die eine 2,5- und 2,7-fache LRP6-Überexpression zeigten (Abb. E-23B).

E.3.1.3 *Gaussia Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten LRP5-hMSC*

Zur Bestimmung der Gaussia Luciferase-Aktivität wurden die stabilen Populationen zunächst weiter expandiert, wobei die beiden HA-LRP6 Populationen ihr Wachstum einstellten. Die verbleibende Population an LRP5-hMSC wurde parallel zu stabilen Mock-hMSC ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die transiente Transfektion mit dem TCF/LEF-Reportergen-Plasmid pN3-Bar-Gluc. Die Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität wurde unter basalen Bedingungen und nach Wnt-3a-Applikation ermittelt. Unter basalen Bedingungen steigerte sich die β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion um das 3,3-fache und unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen um das 4,0-fache (Abb. E-24).

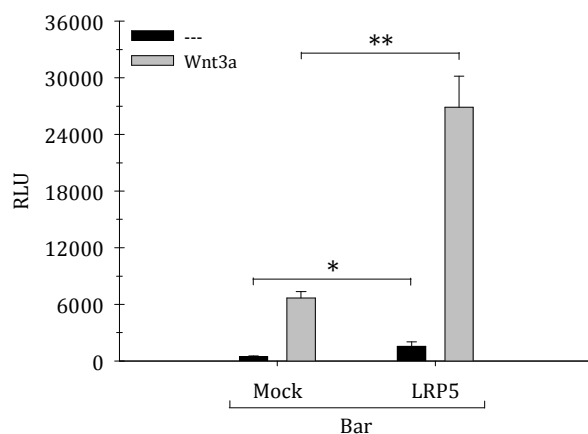


Abb. E-24: Gaussia Luciferase-Aktivität in stabil transfizierten hMSC-Populationen.

hMSC wurden stabil mit pN3-Mock oder pN3-LRP5 transfiziert. Nach transienter Transfektion des TCF/LEF-Reportergen-Plasmides pN3-Bar-Gluc wurde die Aktivität der Gaussia Luciferase unter basalen sowie unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen ermittelt.

E.3.2 Generierung stabil transfizierter hMSC mit dem Φ C31-Integrase-System zur ortsspezifischen Integration

Bei der ortsspezifischen Integration von DNA in die gDNA von hMSC mit dem Φ C31-Integrase-System wird die episomal vorliegende Plasmid-DNA in der attB-Sequenz geöffnet und in eine pseudo attP-Sequenz der gDNA inseriert. Diese unidirektionale Insertion wird durch die koexprimierte Φ C31-Integrase katalysiert.

E.3.2.1 *Klonierung der verschiedenen pN3-attB-LRP-Plasmide*

Für die Klonierung der verschiedenen pN3-attB-LRP-Plasmide musste zunächst der entsprechende Kontrollvektor pN3-attB-Mock generiert werden. Dazu wurde der Vektor

pEGFP-N3-attB (Abb. E-25A) mit *Bam*HI und *Not*I verdaut, um die CDS von EGFP herauszuschneiden. Das dem Vektorrückgrat entsprechende Fragment wurde nach einer Klenow *fill-in* Reaktion mit sich selbst ligiert, wodurch der Vektor pN3-attB-Mock entstand (Abb. E-25B).

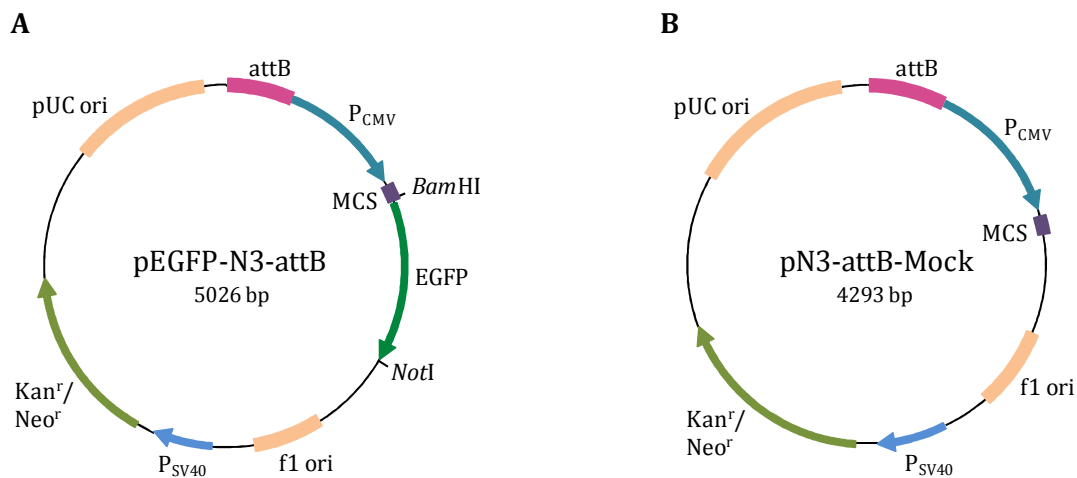


Abb. E-25: Plasmidkarten der Vektoren pEGFP-N3-attB und pN3-attB-Mock.

attB: bakterielle Rekombinationssequenz attB; P_{CMV}: früher Promotor des humanen Cytomegalievirus; MCS: multiple Klonierungsstelle; EGFP: CDS des EGFP; f1 ori: Einzelstrang-Replikationsursprung; P_{SV40}: SV40 Promotor; Kan^r/Neo^r: Kanamycin-/Neomycin-Resistenzgen; pUC ori: Plasmid-Replikationsursprung.

Die N- und C-terminal getaggten LRP-Sequenzen wurden über die in Tab. E-1 aufgelisteten Restriktionsenzyme in pN3-attB-Mock eingeführt.

Tab. E-1: Restriktionsenzyme zur Klonierung der getaggten LRP-Sequenzen in pN3-attB-Mock.

Getaggte LRP-Sequenz	5'-RE	3'-RE
HA-LRP6	<i>Nde</i> I	<i>Xba</i> I
LRP6-HA	<i>Nde</i> I	<i>Fsp</i> I
2xFlag-LRP5	<i>Nhe</i> I	<i>Xba</i> I
LRP5-2xFlag	<i>Nde</i> I	<i>Fsp</i> I

E.3.2.2 Kotransfektion der verschiedenen pN3-attB-Plasmide mit pCMVInt

Zur Generierung stabiler hMSC wurden diese in der 4. Passage mit dem jeweiligen pN3-attB-Plasmid und dem Plasmid pCMVInt kotransfiziert. Die Selektion stabil transfizierter hMSC und deren Expansion erfolgte wiederum unter Kultivierung mit Geneticin.

E.3.2.3 LRP-Expressionslevel auf mRNA-Ebene

Mit dem ΦC31-Integrase-System konnten folgende, verschiedene LRP-Populationen hergestellt werden: 1 x 2xFlag-LRP5, 2 x LRP5-2xFlag und 1 x HA-LRP6. In diesen Populationen wurde das mRNA-Expressionslevel des entsprechenden Wnt-Korezeptors mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. E-26). Die LRP5-hMSC wiesen Überexpressionsraten von 5-fach, 15-fach und 320-fach auf. Bei der LRP6-Population ergab sich eine 5-fache Überexpression.

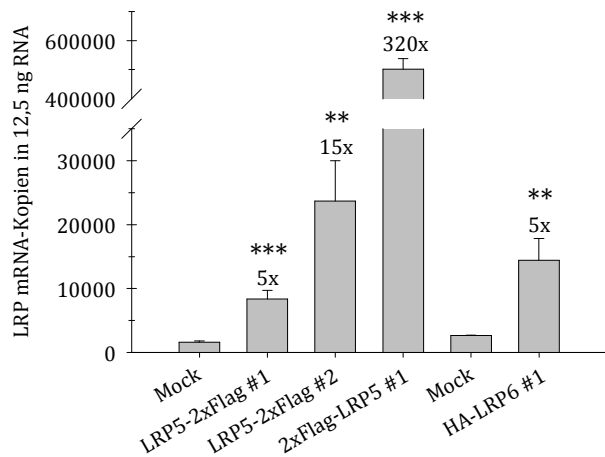


Abb. E-26: LRP mRNA-Expressionslevel in stabil transfizierten hMSC-Populationen.

Nach stabiler Transfektion von hMSC mit den jeweiligen pN3-attB-Expressionsplasmiden erfolgte die Bestimmung des entsprechenden LRP mRNA-Levels mittels qRT-PCR.

E.3.2.4 Einfluss der stabilen LRP-Expression auf die Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP

In einem nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob die stabile LRP-Expression in diesen hMSC-Populationen einen Einfluss auf die Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP ausübt. Dazu wurde das mRNA-Expressionslevel dieser Gene mittels qRT-PCR quantifiziert. Cyclin D1 (Abb. E-27A) war in allen LRP-Populationen erhöht, wohingegen für MT1-MMP (Abb. E-27B) kein signifikanter Unterschied messbar war.

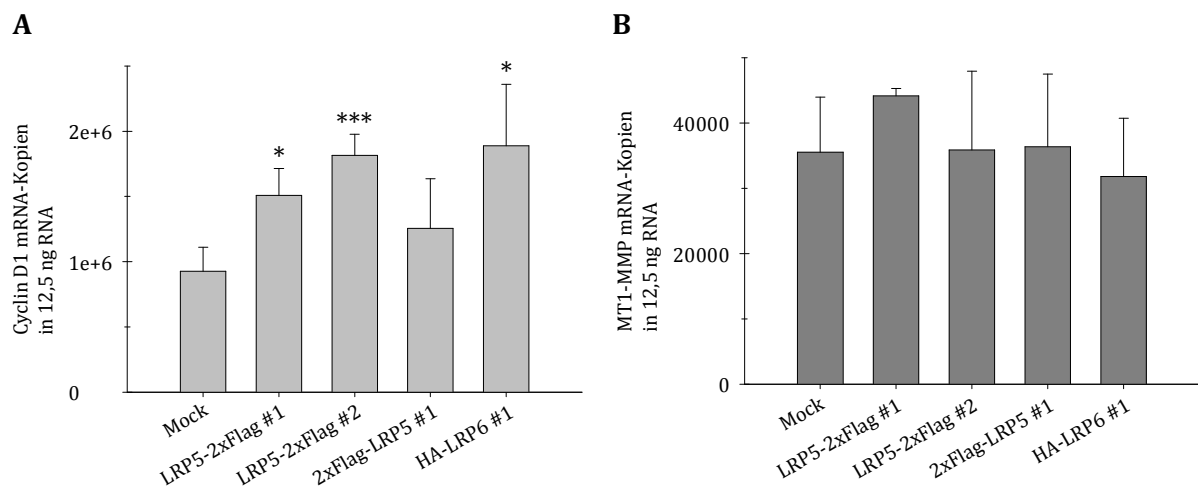


Abb. E-27: mRNA-Expressionslevel der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP in stabil LRP-transfizierten hMSC-Populationen.

Die stabil LRP-transfizierten hMSC-Populationen wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich der mRNA-Expression der Wnt-Zielgene Cyclin D1 (A) und MT1-MMP (B) untersucht.

E.3.2.5 Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Expression

Die stabilen LRP-hMSC wurden zur Bestimmung der Gaussia Luciferase-Aktivität weiter expandiert, wobei abermals die LRP6-exprimierende Population das Wachstum einstellte. Für die Messung der Reporterprotein-Aktivität unter basalen sowie Wnt-3a-

stimulatorischen Bedingungen wurden die stabil LRP5 überexprimierenden hMSC ausgesät und 24 Stunden später mit dem Reporter-gen-Plasmid pN3-Bar-GLuc trans-fiziert. Als Kontrolle dienten parallel dazu ausgesäte Mock-hMSC. Sowohl unter basalen als auch unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen wiesen die 3 LRP5-Populationen eine erhöhte β -Catenin-vermittelte Signalaktivität auf (Abb. E-28). Auffallend war dabei, dass die LRP5-hMSC-Population mit der 320-fachen Überexpressionsrate (2xFlag-LRP5 #1) eine deutlich geringere Aktivierung der Gaussia Luciferase induzierte als die 5- und 15-fach LRP5-überexprimierenden Populationen LRP5-2xFlag #1 und LRP5-2xFlag #2. Unter basalen Bedingungen wies die hMSC-Population 2xFlag-LRP5 #1 nur eine Induktion der Gaussia Luciferase-Aktivität von 2,5-fach auf, wohingegen die beiden Populationen LRP5-2xFlag #1 und LRP5-2xFlag #2 eine um das 13,8- bzw. 22,8-fach gesteigerte Reporterprotein-Aktivität zeigten. Während die Applikation von Wnt-3a bei der Population 2xFlag-LRP5 #1 lediglich zu einer 4,1-fach erhöhten Aktivität der Gaussia Luciferase führte, war für die beiden anderen hMSC-Populationen eine Stei-gerung von 5,2- bzw. 8,7-fach zu verzeichnen. Die Signifikanzen wurden in Relation zu den entsprechend behandelten Mock-hMSC bestimmt.

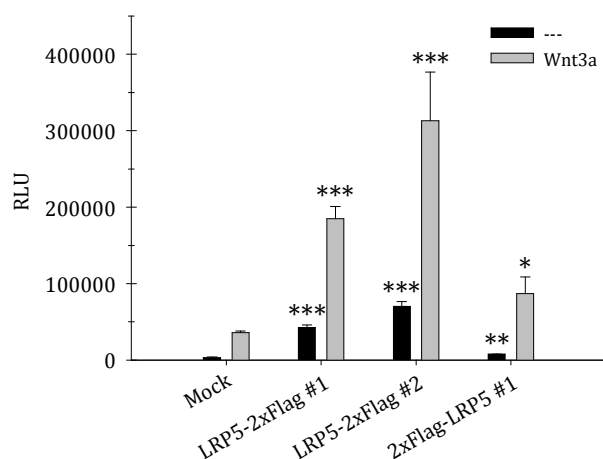


Abb. E-28: Aktivität der Gaussia Luciferase in stabil LRP5-transfizierten hMSC-Populationen.

hMSC wurden stabil mit verschiedenen pN3-attB-LRP5 Plasmiden transfiziert. Nach transienter Trans-fektion mit dem Reporter-gen-Plasmid pN3-Bar-GLuc erfolgte die Bestimmung der β -Catenin-abhängigen Gaussia Luciferase-Aktivität.

E.4 Differenzierung von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC

Es ist bekannt, dass sich der Wnt/ β -Catenin Signalweg und die adipogene Differen-zierung wechselseitig beeinflussen. Erst kürzlich wurde eine Inhibition der Adipogenese – vermittelt durch kanonisches Wnt-Signaling – in hMSC beschrieben (Shen et al., 2011). Vor diesem Hintergrund sollte die β -Catenin-abhängige Signaltransduktion mit Hilfe von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC sowohl bei der adipogenen als auch bei der osteogenen Differenzierung untersucht werden.

E.4.1 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC mit einer Konfluenz von 90 % in Zellkulturplatten mit 12 Kavitäten ausgesät. Die Differenzierung unter basalen und Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen wurde am darauffolgenden Tag chemisch durch die Zugabe von adipogenem Induktionsmedium induziert. Abweichend vom regulären Protokoll, welches einen zyklischen Wechsel zwischen Induktions- und Erhaltungsmedium vorsieht, wurden die TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC für sieben Tage ausschließlich mit Induktionsmedium kultiviert. Zum Vergleich dienten TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC, die mit Kontrollmedium behandelt wurden.

E.4.1.1 Einfluss der adipogenen Differenzierung auf die Gaussia Luciferase-Expression

Die Aktivität des Reporterproteins Gaussia Luciferase wurde über den gesamten Differenzierungszeitraum bestimmt und ist in Abb. E-29 vergleichend an Tag 1 (A) und Tag 7 (B) dargestellt. An Tag 1 zeigte sich nach Wnt-3a-Applikation im Vergleich zum basalen Zustand sowohl unter Kontroll- als auch adipogenen Differenzierungsbedingungen eine erhöhte Gaussia Luciferase-Aktivität, wobei die Induktionsrate unter Differenzierungsbedingungen deutlich niedriger ausfiel. Die Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium führte unter basalen sowie Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen zu einem Einbruch der Reporterprotein-Aktivität. Diese Abnahme der Gaussia Luciferase-Aktivität verstärkte sich fortlaufend über den Differenzierungszeitraum und war an Tag 7 deutlich erkennbar.

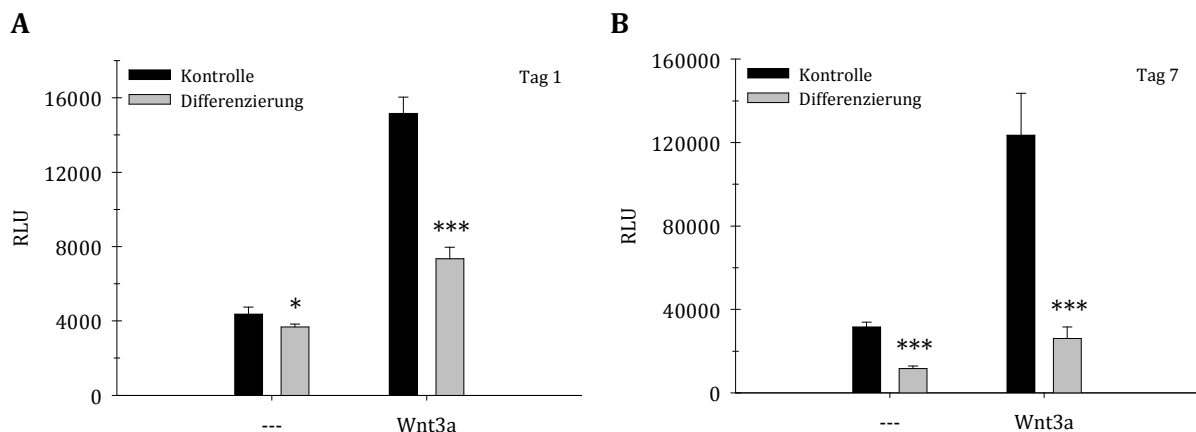


Abb. E-29: Gaussia Luciferase-Aktivität von adipogen differenzierten TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC. TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC wurden chemisch in die adipogene Richtung differenziert. Die Aktivität der Gaussia Luciferase wurde vergleichend an Tag 1 (A) und Tag 7 (B) gemessen.

E.4.1.2 Einfluss der adipogenen Differenzierung auf die Expression des Transkriptionsfaktors PPAR- γ

Mittels qRT-PCR wurde die transkriptionelle Veränderung des adipogenen Markers Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPAR- γ) an Tag 7 untersucht (Abb. E-30). PPAR- γ erhöhte sich nach chemischer Induktion der Adipogenese unter basalen

Bedingungen um das 175-fache im Vergleich zur Kontrolle. Unter Wnt-3a-stimulierenden Bedingungen war ein Anstieg um das 166-fache zu beobachten. Ein Vergleich des PPAR- γ -Transkriptionslevels unter Induktionsbedingungen zeigte eine um 42 % reduzierte Expression nach Wnt-3a-Applikation. Unter Kontrollbedingungen war eine vergleichbare prozentuale Abnahme des Transkriptionsfaktors messbar.

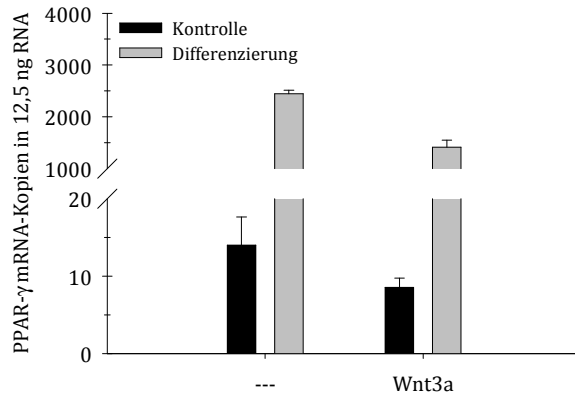


Abb. E-30: mRNA-Expressionslevel des Transkriptionsfaktors PPAR- γ in adipogen differenzierten TCF/LEF-Reportergeren-hMSC.

Nach adipogener Differenzierung von TCF/LEF-Reportergeren-hMSC für sieben Tage wurde die transkriptionelle Veränderung des adipogenen Markers PPAR- γ mittels qRT-PCR bestimmt.

E.4.2 Osteogene Differenzierung

Zur Differenzierung in die osteogene Richtung wurden die TCF/LEF-Reportergeren-hMSC ebenfalls mit 90 % Konfluenz in eine Zellkulturplatte mit 12 Kavitäten ausgesät und am nächsten Tag durch Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums chemisch induziert. Die Kultivierung erfolgte analog zur adipogenen Differenzierung für sieben Tage, wobei als Vergleich wiederum TCF/LEF-Reportergeren-hMSC dienten, die mit Kontrollmedium kultiviert wurden.

E.4.2.1 Einfluss der osteogenen Differenzierung auf die Gaussia Luciferase-Expression

Die Gaussia Luciferase-Aktivität wurde wiederum über den gesamten Zeitraum ermittelt, wobei Tag 1 und Tag 7 in Abb. E-31 gegenübergestellt sind. Im Vergleich mit den basalen Bedingungen resultierte die Applikation von Wnt-3a unter Kontrollbedingungen an Tag 1 (Abb. E-31A) in einer deutlichen Steigerung der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion, wohingegen nach Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium lediglich eine minimale Zunahme der Gaussia Luciferase-Aktivität messbar war. Unter basalen Bedingungen zeigte die Behandlung mit Differenzierungsmedium keinen Einfluss auf die Reporterprotein-Aktivität. Die an Tag 1 beobachteten Unterschiede in Bezug auf die β -Catenin-abhängige Signaltransduktion fielen an Tag 7 (Abb. E-31B) vergleichbar aus.

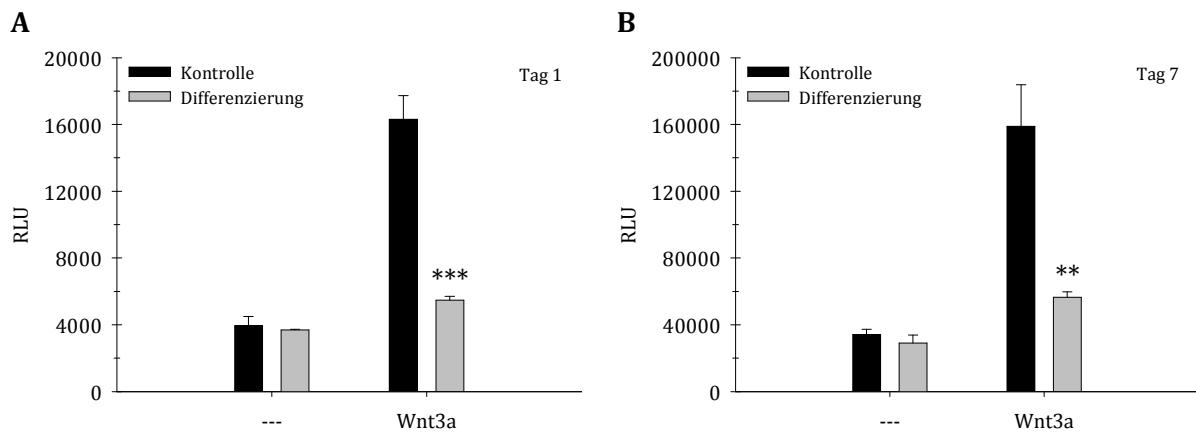


Abb. E-31: Aktivität der Gaussia Luciferase von osteogen differenzierten TCF/LEF-Reportergen-hMSC.

Nach chemisch induzierter Differenzierung von TCF/LEF-Reportergen-hMSC in die osteogene Richtung wurde an Tag 1 (A) und an Tag 7 (B) vergleichend die Gaussia Luciferase-Aktivität ermittelt.

E.4.2.2 Einfluss der osteogenen Differenzierung auf den osteogenen Marker Decorin

Vergleichend zum Einfluss der osteogenen Differenzierung hinsichtlich der Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase-Aktivität wurde die Veränderung des osteogenen Markers Decorin an Tag 7 mittels qRT-PCR untersucht (Abb. E-32). Nach chemischer Induktion der Osteogenese steigerte sich die Expression von Decorin unter basalen Bedingungen um das 5,1-fache im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation mit Wnt-3a führte zu einer 4,5-fachen Erhöhung von Decorin in den differenzierten Zellen.

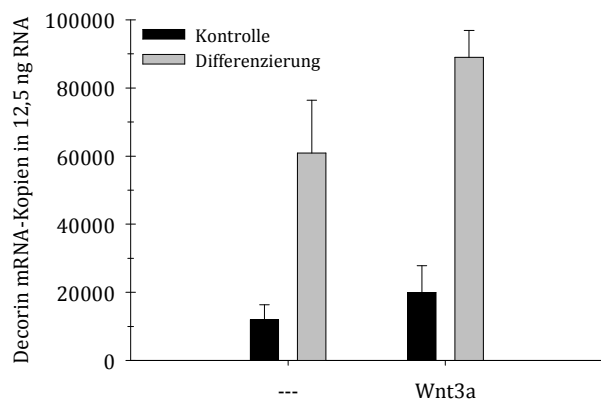


Abb. E-32: Transkriptionelle Veränderung des osteogenen Markers Decorin in osteogen differenzierten TCF/LEF-Reportergen-hMSC.

Mittels qRT-PCR wurde das mRNA-Expressionslevel des osteogenen Markers Decorin nach Differenzierung von TCF/LEF-Reportergen-hMSC in die osteogene Richtung an Tag 7 bestimmt.

E.5 Rolle des Wnt-Korezeptors LRP6 in der Differenzierung von hMSC

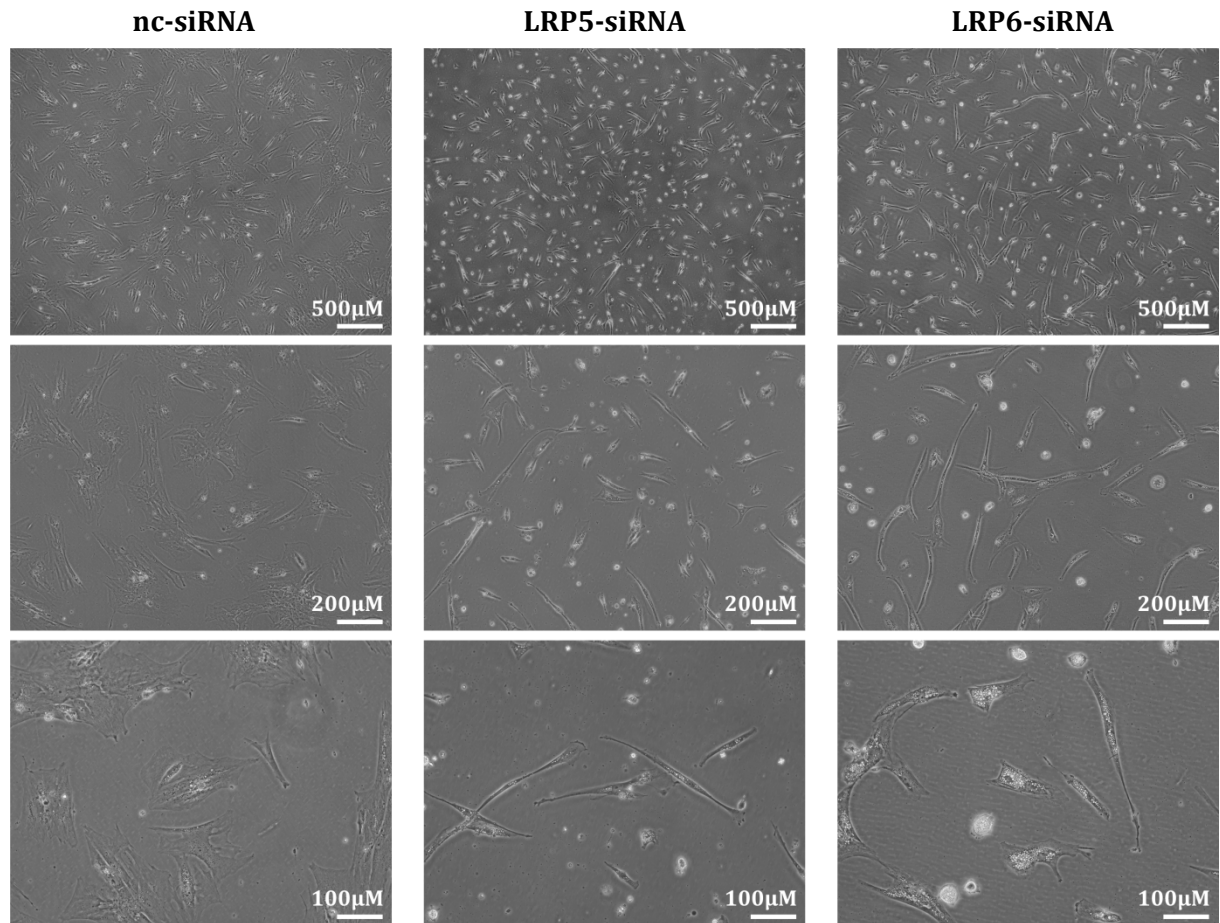
Aufgrund der Tatsache, dass zum einen der kanonische Wnt-Weg und adipogene bzw. osteogene Differenzierungsprozesse in einem engen Zusammenhang stehen, und die Wnt-Korezeptoren zum anderen deutliche Unterschiede hinsichtlich der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion aufwiesen, wurde weiterführend evaluiert, ob die Anwesenheit oder das Fehlen von LRP5 oder LRP6 einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von hMSC ausübt.

E.5.1 Bildung fettähnlicher Vakuolen in hMSC nach RNAi gegen LRP6

Mit dem Ziel, den Knockdown von LRP5 bzw. LRP6 über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhalten, wurden zwei aufeinanderfolgende Transfektionen mit den entsprechenden LRP-siRNAs im Abstand von drei Tagen durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche, morphologische Veränderung der mit LRP6-siRNA transfizierten hMSC beobachtet werden, die sich durch eine Akkumulation von fettähnlichen Vakuolen im Vergleich zur Kontrolle (nc-siRNA) auszeichnete (Abb. E-33A,B). Im Gegensatz dazu ging der Knockdown von LRP5 mit einer deutlich geringeren Bildung von fettähnlichen Vakuolen einher (Abb. E-33A,B).

In Abb. E-33A sind drei verschiedene Vergrößerungen der entsprechend transfizierten hMSC abgebildet. Abb. E-33B zeigt einen Ausschnitt der größten Vergrößerung. Um zu analysieren, ob diese Vakuolen wirklich Lipide enthalten, wurde fünf Tage nach der ersten siRNA Transfektion eine Oil Red O Färbung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch keine Oil Red O gefärbten Fettvakuolen detektierbar.

A



B

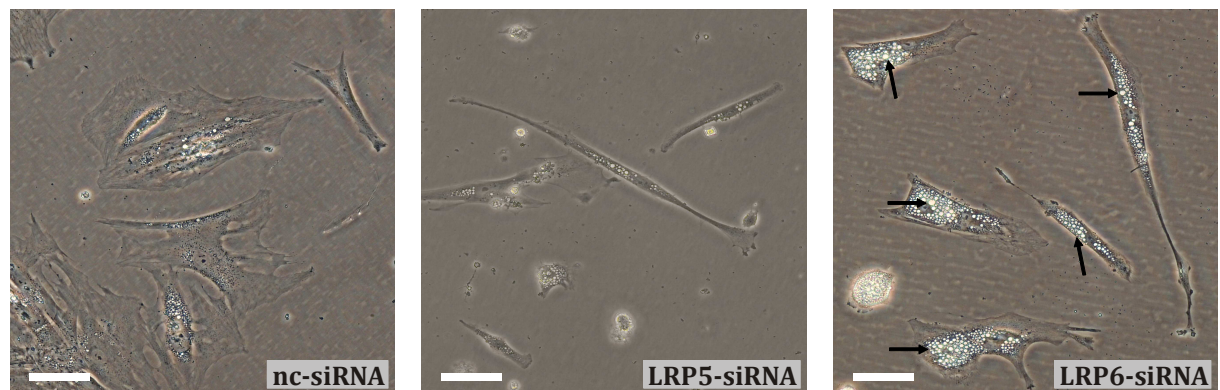


Abb. E-33: Bildung fettähnlicher Vakuolen in hMSC nach RNAi gegen LRP6.

RNAi gegen LRP5 bzw. LRP6 wurde durch zweimalige siRNA-Transfektion im Abstand von drei Tagen induziert. An Tag 5 nach der ersten Transfektion war bei den LRP6 Knockdown-hMSC eine Akkumulation von fettähnlichen Vakuolen im Vergleich zu nc-siRNA transfizierten hMSC (Kontrolle) zu beobachten.

A) Darstellung der entsprechend transfizierten hMSC in drei unterschiedlichen Vergrößerungen

B) Ausschnitt der größten Vergrößerung (Skalierungsbalken = 50 µM)

E.5.2 Einfluss des LRP6-Knockdowns auf den Transkriptionsfaktor PPAR- γ

Mit dem Ziel zu analysieren, ob diese Veränderungen des zellulären Phänotyps mit einer Änderung des adipogenen Transkriptionsfaktors PPAR- γ assoziiert waren, wurde dessen mRNA-Expressionslevel nach RNAi gegen LRP5 oder LRP6 mittels qRT-PCR bestimmt. Während RNAi gegen LRP5 nur zu einem leichten Anstieg von PPAR- γ führte (1,7-fach), resultierte der Knockdown von LRP6 im Vergleich zu Kontroll-transfizierten hMSC in einer 5,5-fach gesteigerten Expression von PPAR- γ (Abb. E-34).

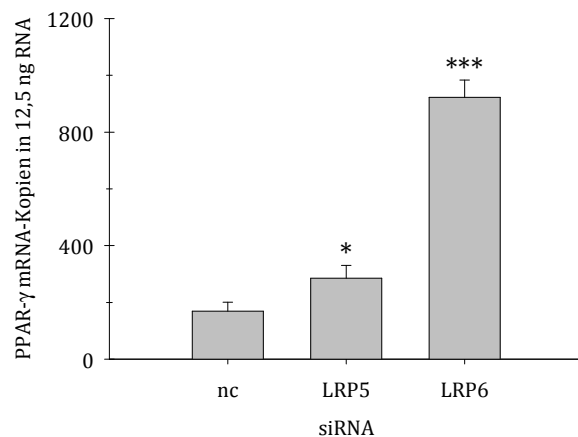


Abb. E-34: mRNA-Expression von PPAR- γ nach Knockdown von LRP5 oder LRP6.

Nach Induktion von RNAi durch zwei aufeinanderfolgende Transfektionen von hMSC mit den entsprechenden siRNAs gegen die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 im Abstand von drei Tagen erfolgte die Bestimmung der transkriptionellen Veränderung von PPAR- γ mittels qRT-PCR.

E.5.3 Repression der PPAR- γ Bildung mittels Rescue der LRP6-Expression

Für die Untersuchung, ob ein Rescue von LRP6 in diesen fettähnliche Vakuolen enthaltenden hMSC einen Rückgang der PPAR- γ Expression bewirken kann, wurde zunächst ein verlängerter Knockdown von LRP6 durchgeführt. Sechs Tage nach Induktion der RNAi gegen LRP6 wurden diese Zellen entweder mit pN3-LRP6 oder zur Kontrolle mit pN3-Mock transfiziert. Sowohl die Überexpression von LRP6 als auch dessen Rescue führten zu einer erheblich reprimierten PPAR- γ Bildung (Abb. E-35A), begleitet von einer verstärkten Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion (Abb. E-35B). Dieser supprimierende Effekt von LRP6 auf die Expression von PPAR- γ war unter basalen wie Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen zu beobachten, was auf eine inverse Korrelation zwischen der LRP6-vermittelten Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und der transkriptionellen Veränderung des adipogenen Markers PPAR- γ hindeutet. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen wurde zudem die Auswirkung auf das Wnt-Zielgen Axin2 untersucht. Die Veränderungen des Axin2 mRNA-Expressionslevels (Abb. E-35C) korrelierten dabei mit den entsprechenden Ergebnissen der Reporter-gen-Aktivität (Abb. E-35B).

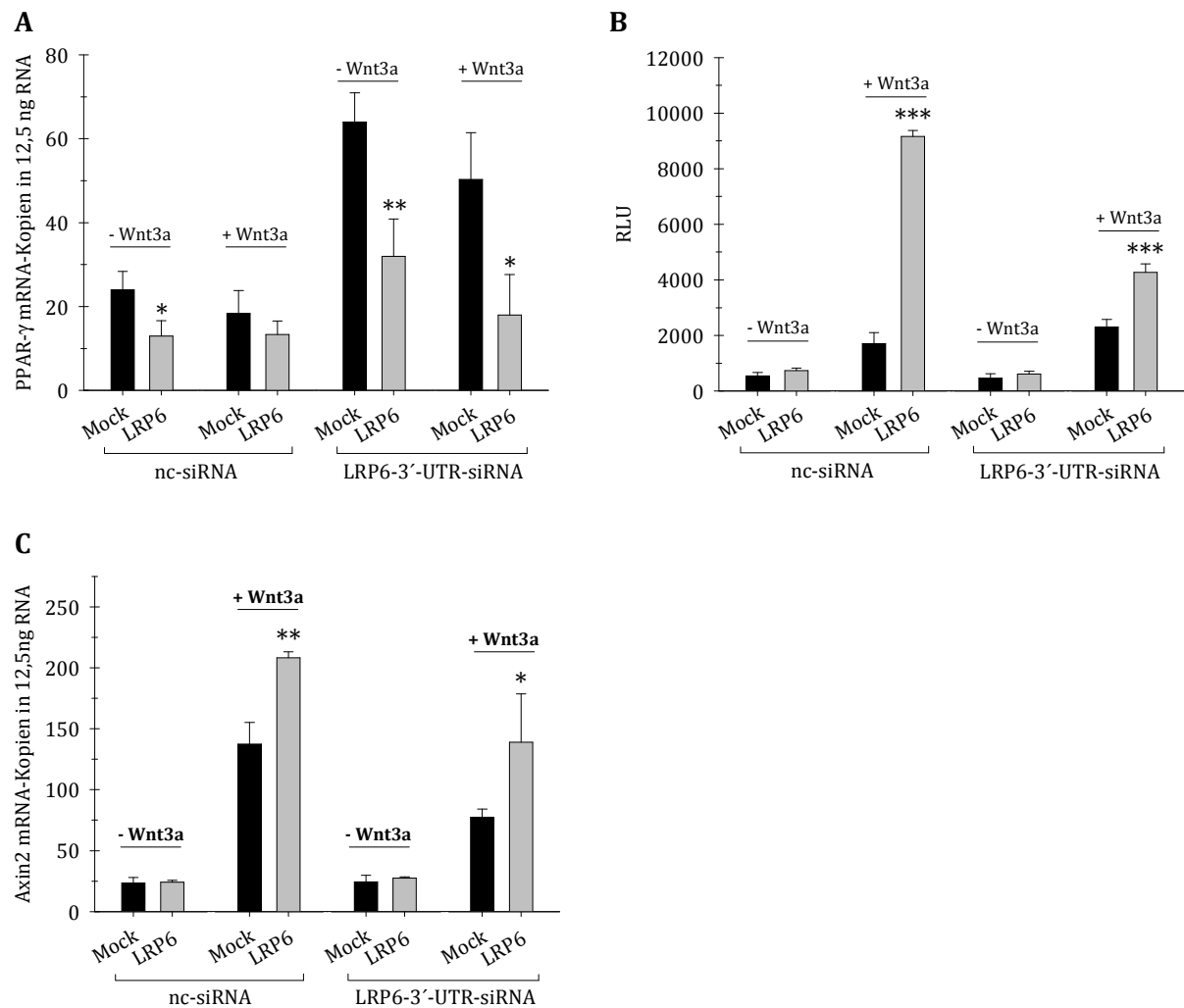


Abb. E-35: Repression der adipogenen Differenzierung durch Rescue der LRP6-Expression.

RNAi gegen LRP6 wurde durch zwei aufeinanderfolgende Transfektionen im Abstand von drei Tagen induziert. An Tag 6 nach siRNA Transfektion wurden diese hMSC mit pN3-Mock oder pN3-LRP6 zusammen mit dem TCF/LEF-Reportergen-Plasmid pN3-Bar-GLuc kotransfiziert.

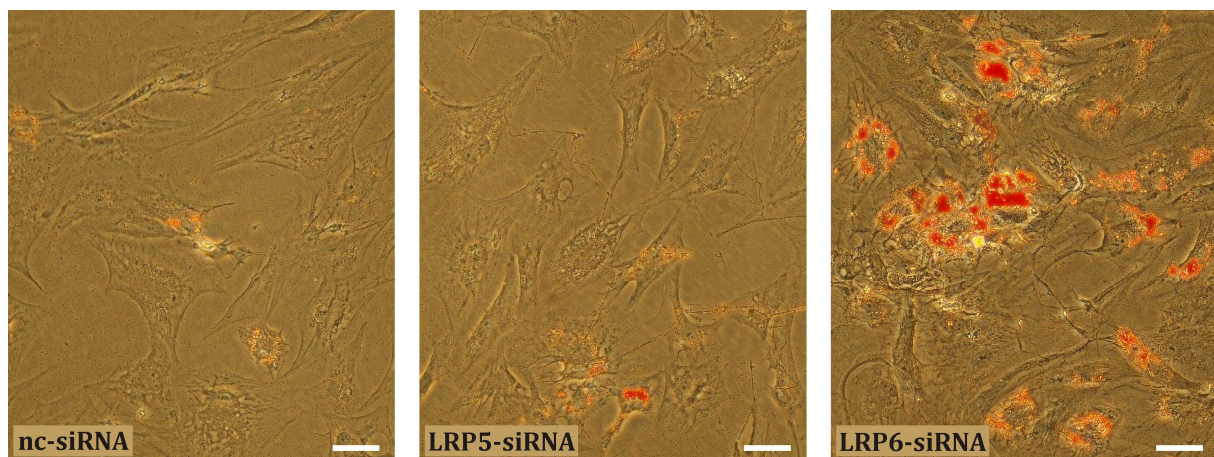
- A) Die transkriptionelle Veränderung von PPAR-γ wurde sowohl unter basalen als auch Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen mittels qRT-PCR bestimmt.
- B) In derselben hMSC-Population erfolgte die Quantifizierung der Gaussia Luciferase-Aktivität ohne und mit Wnt-3a-Applikation.
- C) Die Auswirkungen auf das Wnt-Zielgen Axin2 wurden ebenfalls in dieser hMSC-Population mittels qRT-PCR ermittelt.

E.5.4 Verstärkte, chemisch induzierte adipogene Differenzierung nach RNAi gegen LRP6

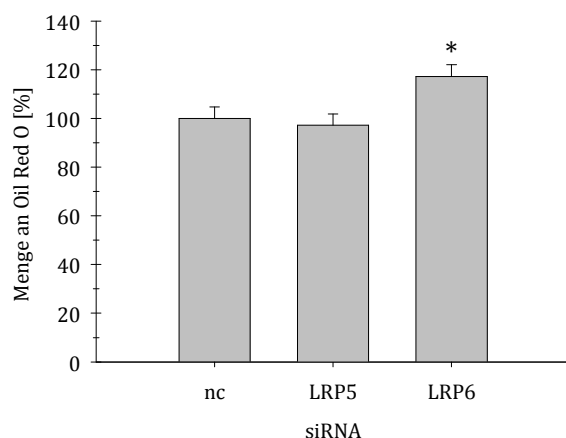
Der Knockdown von LRP6 in hMSC führte zu einer gesteigerten Bildung von fettähnlichen Vakuolen, begleitet von einem Anstieg des adipogenen Markers PPAR-γ. Basierend auf diesen Beobachtungen ergab sich die Frage, ob der Knockdown von LRP6 lediglich die frühe Adipogenese einleitet und somit für eine endgültige Differenzierung in die adipogene Richtung eine zusätzliche Stimulation mit adipogenen Substanzen nötig ist.

Mit dem Ziel, diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurden hMSC im Abstand von fünf Tagen zweimal mit nc-siRNA (Kontrolle) und den entsprechenden LRP-siRNAs transfiziert. Zwei Tage später erfolgte die chemische Induktion der Adipogenese, wobei die transfizierten hMSC zwei Wochen lang differenziert wurden. hMSC, die einen Knockdown von LRP6 trugen, wiesen dabei erheblich mehr Oil Red O gefärbte Lipidvakuolen im Vergleich zu nc-siRNA oder LRP5-siRNA transfizierten hMSC auf (Abb. E-36A). Die Quantifizierung des eingelagerten Oil Red O Farbstoffes zeigte ebenfalls, dass RNAi gegen LRP6 mit einer erhöhten Bildung an Fettvakuolen einherging (Abb. E-36B). Mittels qRT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die gesteigerte Akkumulation an Fettvakuolen in LRP6 Knockdown-hMSC mit einer deutlich erhöhten PPAR- γ Expression assoziiert war (Abb. E-36C). Im Gegensatz dazu zeigten LRP5-siRNA transfizierte hMSC keine Veränderung hinsichtlich der Expression von PPAR- γ (Abb. E-36C).

A



B



C

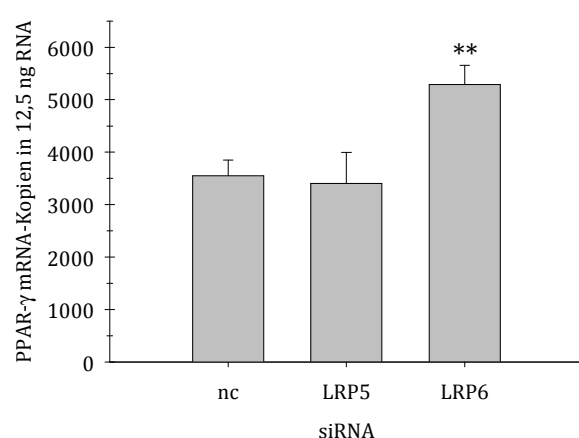


Abb. E-36: Verstärkte, chemisch induzierte adipogene Differenzierung von hMSC nach RNAi gegen LRP6.

hMSC wurden zweimal in einem Abstand von fünf Tagen mit den siRNAs gegen LRP5 bzw. LRP6 transfiziert. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte eine chemisch induzierte adipogene Differenzierung über einen Zeitraum von zwei Wochen.

- A) Oil Red O Färbung der Lipidvakuolen (Skalierungsbalken = 50 μ M)
- B) Photometrische Quantifizierung des Oil Red O Farbstoffes
- C) Bestimmung der PPAR- γ mRNA-Expression mittels qRT-PCR

F DISKUSSION

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt nicht nur während der Embryogenese, der Aufrechterhaltung des Stammzell-Pools und bei der Entstehung verschiedener Krebsformen eine wichtige Rolle, sondern ist gerade in hMSC auch maßgeblich an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Invasion/Migration und Differenzierung beteiligt. Zur Prävention und Behandlung von Krankheiten, die mit Veränderungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg assoziiert sind, ist ein detailliertes Verständnis der Signaltransduktionsmechanismen erforderlich, um eine zielgerichtete Entwicklung spezifischer Wirkstoffe wie beispielsweise *small molecule compounds* zu ermöglichen.

Bezüglich der Initiation der Signaltransduktion an der Zelloberfläche von hMSC ist bislang jedoch nur äußerst wenig bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus speziell auf die Aufklärung der molekularen Funktion sowie der physiologischen Bedeutung der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von hMSC gelegt.

F.1 Das TCF/LEF-Reportergen-System in hMSC

F.1.1 Vergleich des konventionellen TOP/FOP-Flash-Reportergen-Systems mit dem TCF/LEF-Reportergen-System

Vor dem Hintergrund, dass für hMSC kein geeignetes β -Catenin-abhängiges Reportergen-System existiert, um entsprechende Signaltransduktionsprozesse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu evaluieren, wurde in unserem Labor ein TCF/LEF-Reportergen-System entwickelt und in einem transienten Ansatz mit dem konventionellen TOP/FOP-Flash-Reportergen-System verglichen. In beiden Systemen diente die Gaussia Luciferase, die in den Zellkulturüberstand sezerniert wird, als Reporterprotein, so dass die gemessenen Aktivitäten direkt untereinander verglichen werden konnten (Tannous, 2009; Tannous et al., 2005).

Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der Gaussia Luciferase beim TCF/LEF-Reportergen-System nach Applikation von LiCl, vor allem aber nach Stimulation mit Wnt-3a, stärker induzierbar war (1,2-fach mit LiCl bzw. 2,2-fach mit Wnt-3a) als beim konventionellen TOP/FOP-Flash-Reportergen-System (1,1-fach mit LiCl bzw. 1,3-fach mit Wnt-3a). Somit zeichnet sich das TCF/LEF-Reportergen-System durch eine höhere Sensitivität aus, was für die Quantifizierung von Signaltransduktionsprozessen von entscheidender Bedeutung ist. Die Expression des Reporterproteins Gaussia Luciferase war in diesem Ansatz aufgrund der transienten Transfektion jedoch zeitlich begrenzt, da im Zellkern episomal vorliegende Plasmid-DNA dem Abbau durch zelluläre Nukleasen unterworfen ist (Colosimo et al., 2000). Eine verlässliche Messung der Gaussia Luciferase-Aktivität war daher nur über einen Zeitraum von 5-7 Tagen möglich.

F.1.2 TCF/LEF-Reportergeren-hMSC und Einflüsse auf ihre Aktivität

Mit dem Ziel, die Reporterprotein-Aktivität über einen längeren Zeitraum evaluieren zu können, wurde das TCF/LEF-Reportergeren-System stabil in hMSC transfiziert. Die erhaltenen TCF/LEF-Reportergeren-hMSC wurden im Hinblick auf die Aktivierbarkeit der Gaussia Luciferase analysiert. Dabei fiel primär auf, dass sich die basale Reportergeren-Aktivität von Population zu Population deutlich unterschied, und eine höhere Basalaktivität gleichzeitig mit einer stärkeren Induzierbarkeit der Gaussia Luciferase nach Applikation von LiCl oder Wnt-3a einherging.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass sich die verschiedenen TCF/LEF-Reportergeren-hMSC-Populationen in ihrer Aktivität so deutlich unterscheiden, könnte in der Regulation der Transgenexpression begründet liegen (Colosimo et al., 2000). Die Expression eines Transgens wird zum einen durch die Anzahl der Genkopien innerhalb der Zelle beeinflusst, die durch eine unterschiedliche Anzahl von Plasmid-Integrationsereignissen zustande kommt. Darüber hinaus spielen dabei auch die Transkriptionsrate des entsprechenden Gens, die Stabilität des mRNA-Transkriptes sowie der Integrationsort im Genom und die dort vorliegenden DNA-Sequenzen selbst eine entscheidende Rolle. Hierbei sind vor allem Modifikationen der umgebenden Chromatinstruktur wichtig (Recillas-Targa, 2006), welche unter anderem durch die Aktivität von Histonacetylasen und Histondeacetylasen moduliert wird (Meyer, 2000). So ist acetyliertes, offenes Chromatin besser für die interagierenden Transkriptionsfaktoren zugänglich als deacetyliertes, kondensiertes Chromatin (Eberhardter and Becker, 2002), wodurch eine höhere Expressionsrate bedingt wird.

In Bezug auf die Gaussia Luciferase-Aktivität der Reportergeren-hMSC wurden auch mögliche Einflüsse wie Expansionsart und Passagenzahl untersucht.

Im Rahmen des normalen Expansionsprotokolls wurden die Reportergeren-hMSC mit einer Konfluenz von 30 % ausgesät, wodurch aufgrund der räumlichen Nähe die Ausschüttung parakriner Wachstumsfaktoren induziert wird, die ein homogenes Wachstum der hMSC-Population bewirken. Für die klonale Expansion wurden die Reportergeren-hMSC mit einer Konfluenz von weniger als 1 % ausgesät. Dabei befinden sich die einzelnen hMSC in einer deutlich größeren räumlichen Distanz zueinander, wodurch ausgehend von vereinzelter proliferierender hMSC Zellklone entstehen, die anschließend eine heterogene hMSC-Population bilden (Russell et al., 2011). Die Aktivität des Reporterproteins war nach normaler sowie klonaler Expansion vergleichbar.

Aufgrund der Passage ergaben sich jedoch leichte Unterschiede in der Aktivierbarkeit des Reporterproteins. Sowohl im Basalzustand als auch nach Applikation von LiCl bzw. Wnt-3a war mit zunehmender Passage eine stetige Abnahme der absoluten Gaussia Luciferase-Aktivität zu verzeichnen. Dies deutet darauf hin, dass höhere Zellpassagen möglicherweise mit einer geringeren Wnt-Aktivität assoziiert sind.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das TCF/LEF-Reportergeren-System sehr gut dazu geeignet ist, Signaltransduktionsprozesse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in hMSC

über einen längeren Zeitraum spezifisch und mit hoher Sensitivität näher zu analysieren. Der erfolgreiche Einsatz solcher Reporter-gen-Systeme in transgenen Organismen sowie kultivierten Zellen bestätigt unsere Beobachtung (Barolo, 2006).

F.1.3 Adipogene und osteogene Differenzierung von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC

Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität des TCF/LEF-Reporter-gen-Systems wurden Reporter-gen-hMSC auch für die Untersuchung von Veränderungen der β -Catenin-abhängigen Signaltransduktion nach Induktion von adipogener bzw. osteogener Differenzierung eingesetzt.

F.1.3.1 Adipogene Differenzierung

Bei der adipogenen Differenzierung von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC (siehe Abb. E-29) war nach Applikation von Wnt-3a im Vergleich zum basalen Zustand sowohl bei der Kultivierung mit Kontrollmedium als auch bei der Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium eine verstärkte Aktivität der Gaussia Luciferase und damit des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zu verzeichnen. Unter adipogenen Differenzierungsbedingungen war im Grundzustand bereits eine Abnahme der Reporterprotein-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten, die sich nach Stimulation mit Wnt-3a deutlich verstärkte.

Analog zum Einfluss auf die β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion wurde auch die Veränderung des spezifischen Transkriptionsfaktors PPAR- γ (Tontonoz et al., 1995) untersucht. Bei PPAR- γ handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der durch Ligandenbindung reguliert wird, und der zusammen mit den beiden anderen Subtypen der PPARs, PPAR- α und PPAR- β/δ , zu der Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren gezählt wird (Michalik et al., 2006). Hinsichtlich PPAR- γ sind vier Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen und die sich vor allem hinsichtlich des Expressionsmusters deutlich unterscheiden (Tyagi et al., 2011). Dabei wird vor allem PPAR- γ 2 hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert. Die transkriptionelle Regulation durch PPAR- γ setzt die Bildung eines heterodimeren Komplexes mit dem Retinoid-X-Rezeptor voraus (Rosen et al., 2000). Nach Bindung eines Liganden interagiert der heterodimere Rezeptorkomplex mit Peroxisom-Proliferator-responsiven Elementen in der Promotorregion von Zielgenen, wodurch deren Transkription initiiert wird (Michalik et al., 2006).

Durch die Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium wurde die PPAR- γ -Expression zwar sowohl unter basalen wie auch unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen um ein Vielfaches gesteigert, jedoch war nach Applikation von Wnt-3a ein deutlich geringeres mRNA-Level von PPAR- γ im Vergleich zum Basalzustand zu verzeichnen.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten, die eine Beteiligung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges an der Regulation von Differenzierungs-

prozessen gezeigt haben. Durch das Wnt-Signal werden adipogene Transkriptionsfaktoren wie PPAR- γ inhibiert, wodurch die Adipogenese reprimiert wird und die Zellen in einem undifferenzierten Zustand verbleiben (Ross et al., 2000). Analog führt auch die Behandlung mit LiCl durch Hemmung der GSK-3 β oder der Einsatz eines spezifischen GSK-3 β -Inhibitors zu einer Inhibition der adipogenen Differenzierung (Bennett et al., 2002; Ross et al., 2000). Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von PPAR- γ mit einer starken Abnahme von β -Catenin assoziiert ist, wodurch der Wnt/ β -Catenin-Signalweg supprimiert wird (Farmer, 2005; Moldes et al., 2003). Daher wird eine reziproke Relation zwischen PPAR- γ und β -Catenin vorgeschlagen (Moldes et al., 2003).

Allerdings können hMSC unter dem Einfluss eines schwachen Wnt/ β -Catenin-Signals in die Adipogenese eintreten (De Boer et al., 2004b), so dass PPAR- γ induziert und dadurch die weitere Differenzierung gefördert werden kann. Eine vermehrte PPAR- γ -Expression führt in der von embryonalen Mausfibroblasten abstammenden Zelllinie 3T3-L1 wiederum zur Reduktion der nukleären β -Catenin-Konzentration, so dass der Wnt-Weg inhibiert und eine terminale adipogene Differenzierung gesichert wird (Moldes et al., 2003).

In umgekehrter Weise wurde gezeigt, dass durch ein starkes β -Catenin-vermitteltes Wnt-Signal die Expression von PPAR- γ und folglich die Adipogenese von hMSC supprimiert wird (De Boer et al., 2004b; Farmer, 2005).

Neben dem Einfluss spezifischer Wnt-Liganden spielt beispielsweise auch die Expression des nukleären β -Catenin Antagonisten *Chibby* bei der Regulation der Adipogenese eine Rolle. *Chibby* wird während des adipogenen Differenzierungsprozesses von 3T3-L1-Zellen gebildet und verhindert durch Bindung an β -Catenin dessen Interaktion mit TCF/LEF, so dass die β -Catenin-vermittelte Transkription reprimiert wird (Li et al., 2007; Prestwich and Macdougald, 2007).

F.1.3.2 Osteogene Differenzierung

Wie bei der adipogenen Differenzierung war auch bei der osteogenen Differenzierung von TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC (siehe Abb. E-31) nach Stimulation mit Wnt-3a im Vergleich mit dem Basalzustand eine erhöhte Gaussia Luciferase-Aktivität in den Kontrollzellen sowie in den differenzierten Zellen zu beobachten, die jedoch in den differenzierten Zellen deutlich geringer ausfiel. Im Gegensatz zur Kultivierung mit adipogenem Differenzierungsmedium resultierte die Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium im basalen Zustand in keiner Veränderung der Gaussia Luciferase-Aktivität.

Zur weiteren Analyse wurde die transkriptionelle Veränderung des osteogenen Markers Decorin bestimmt. Decorin zählt zu den kleinen, leucinreichen Proteoglykanen und ist nicht nur Bestandteil der extrazellulären Matrix, sondern wird auch im Knochen exprimiert (Waddington et al., 2003).

Bei der Kultivierung mit osteogenem Differenzierungsmedium war unter basalen und Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen ein Anstieg der Decorin-mRNA festzustellen, wobei die Zunahme in beiden Fällen unter Wnt-3a-Stimulation verstärkt wurde. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass die frühe Expression von Decorin charakteristisch für die Osteogenese ist (Kamiya et al., 2001) und darüber hinaus unter dem Einsatz von Dexamethason gesteigert wird (Kimoto et al., 1994).

In Bezug auf die *in vitro*-Effekte des Wnt/ β -Catenin-Signalweges auf die osteogene Differenzierung von hMSC existieren jedoch kontroverse Aussagen. So sind neben der aktivierenden Wirkung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (Gregory et al., 2005) auch supprimierende Einflüsse auf die osteogene Differenzierung von hMSC gezeigt worden (Boland et al., 2004; Cho et al., 2006; De Boer et al., 2004a). Man geht allerdings davon aus, dass in Abhängigkeit der Wnt-Konzentration die Osteogenese entweder gefördert oder inhibiert wird, da beispielsweise durch eine hohe Dosis an Wnt-3a die osteogene Differenzierung verstärkt wird (De Boer et al., 2004b), wohingegen aber eine geringe Dosis von Wnt-3a oder die Applikation von LiCl reprimierend wirken (De Boer et al., 2004a; Ling et al., 2009).

Darüber hinaus spielt auch der Differenzierungszustand der Zellen selbst eine entscheidende Rolle. Während der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen fördert, wird die terminale Differenzierung reifer Osteoblasten inhibiert (Ling et al., 2009).

F.2 Molekulare Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 bei der Signaltransduktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg

F.2.1 Endogene Expression der LRPs in hMSC

Zu Beginn dieser Arbeit wurde mittels qRT-PCR und Western-Blot die endogene Expression der beiden Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 in den verwendeten hMSC nachgewiesen. Die Expression von LRP5 in hMSC konnte bereits 2004 gezeigt werden (Etheridge et al., 2004) und wurde vier später durch eine weitere Studie bestätigt (Okoye et al., 2008). In dieser Studie gelang es auch zum ersten Mal die Expression von LRP6 in hMSC nachzuweisen (Okoye et al., 2008). Außerdem sind sowohl für LRP5 als auch für LRP6 bereits ubiquitäre Expressionsmuster in den verschiedensten Geweben beschrieben worden (Brown et al., 1998; Hey et al., 1998).

F.2.2 RNAi-basierte Analysen

F.2.2.1 Knockdown-Effizienz der LRPs

Zur Aufklärung der molekularen Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 im Wnt/ β -Catenin-Signalweg von hMSC wurde zunächst RNAi gegen die beiden LRPs

induziert. Die Knockdown-Effizienz ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig (Reynolds et al., 2004). So sind zum einen thermodynamische Charakteristika wie beispielsweise ein geringer G/C-Gehalt oder die Abwesenheit von internen *Repeats* von entscheidender Bedeutung. Auf der anderen Seite sind auch spezifische, sequenz-bezogene Eigenschaften ausschlaggebend. Die Anwesenheit eines Adenins an den Positionen 3 und 19 ist wünschenswert, da dadurch die Effizienz der siRNA gefördert wird. In diesem Zusammenhang sollte daher auch ein Guanin oder Cytosin an der Position 19 vermieden werden (Reynolds et al., 2004).

Für die beiden Wnt-Korezeptoren wurden entsprechende siRNAs anhand der Kriterien von Reynolds et al. ausgewählt. Die Bestimmung des LRP-Expressionslevels auf mRNA-Ebene zeigte eine ähnliche Knockdown-Effizienz für die beiden Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6, die sich auf 65-88 % belief.

F.2.2.2 Veränderungen der Signaltransduktion nach RNAi gegen die LRPs

Die Auswirkungen der RNAi im Hinblick auf die Wnt/ β -Catenin-abhängige Signalweiterleitung wurden unter basalen sowie Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen analysiert. Unter basalen Bedingungen führte der Knockdown von LRP5 bzw. LRP6 lediglich zu einer geringen Abnahme der Wnt/ β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion. Dagegen resultierte der Knockdown von LRP6 nach Applikation von Wnt-3a in einer deutlichen Abnahme der Gaussia Luciferase-Aktivität, während RNAi gegen LRP5 keinen Einfluss auf die Signaltransduktion zeigte.

Somit weisen unsere Daten darauf hin, dass LRP6 den Hauptrezeptor für Wnt-3a darstellt. Zudem haben neuere Arbeiten in anderen Zellmodellen auch gezeigt, dass LRP6 als Bindungspartner für Wnt-3a an der Zelloberfläche dient, und stützen somit unser Ergebnis, dass Wnt-3a über LRP6 in hMSC die β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion initiieren kann. Anhand der Rekonstitution eines ternären Signalkomplexes aus Fzd8, LRP6 und Wnt-3a konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass Wnt-3a an die β -Propeller-EGF-ähnlichen (PE) Domänen 3 und 4 von LRP6 bindet (Bourhis et al., 2010), die analog zu PE1-PE2 eine funktionelle Einheit bilden (Liu et al., 2009).

In zwei weiteren Studien konnte durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen die Ektodomäne von LRP6 belegt werden, dass Wnt-3a durch Bindung an PE3 bzw. PE3-PE4 die β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion induziert (Ettenberg et al., 2010; Gong et al., 2010). Die Studie von Ettenberg et al. stützt darüber hinaus auch unsere Beobachtung, dass LRP6 im Vergleich zu LRP5 eine dominante Rolle in der Signaltransduktion spielt, da sie demonstriert, dass nach Knockdown von LRP6 in HEK-293-Zellen die Wnt-3a-induzierte Signalweiterleitung verhindert wird (Ettenberg et al., 2010). Außerdem liefert diese Studie einen Hinweis darauf, dass die Dimerisierung von endogenem LRP6 die Signaltransduktion steigern kann.

Darüber hinaus wurde erst vor Kurzem berichtet, dass die Ektodomäne von LRP6 überlappende Bindestellen für den Aktivator Wnt-3a und den Inhibitor Dkk-1 in den PEs enthält (Chen et al., 2011). Mittels einer Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von

LRP6 konnte gezeigt werden, dass Dkk-1 mit PE3 interagieren und dadurch mit Wnt-3a um die entsprechende Bindestelle von LRP6 konkurrieren kann (Cheng et al., 2011). Neben PE3 dient aber auch PE1 von LRP6 als Bindestelle für Dkk-1 (Binnerts et al., 2009; Bourhis et al., 2011), so dass Dkk-1 auch mit Wnt-9b bzw. Wnt-1 um die LRP6-Bindung konkurrieren kann, da PE1-PE2 als Interaktionsfläche für diese beiden Wnts beschrieben wurde (Bourhis et al., 2010; Ettenberg et al., 2010).

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass ein einziges Dkk-1-Molekül beide funktionellen Einheiten der LRP6-Ektodomäne binden kann: PE1-PE2 über den N-Terminus und PE3-PE4 über die C-terminale Domäne (Ahn et al., 2011). Durch diese überlappenden Bindestellen von Aktivatoren und Inhibitoren scheint aufgrund der Bindung von Liganden an den Wnt-Korezeptor LRP6 eine gezielte Regulation der Wnt-Signaltransduktion möglich zu sein, was für die Entwicklung spezifischer Therapeutika von entscheidender Bedeutung ist (Bao et al., 2012).

Die überlappenden Bindestellen von Aktivatoren und Inhibitoren scheinen darüber hinaus für die Modulation der Signalaktivität der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 in Abhängigkeit von spezifischen Wnt-Liganden verantwortlich zu sein. In einer kürzlich veröffentlichten Studie (Goel et al., 2012) mit *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) und *mammary epithelial cells* (MECs) konnte nämlich demonstriert werden, dass nach Applikation von Wnt-3a die Signaltransduktion sowohl von endogenem LRP5 als auch von endogenem LRP6 allein vermittelt werden konnte, wobei sich jedoch LRP6 als deutlich effizienter erwies.

Im Gegensatz dazu war für eine effektive Signaltransduktion durch Wnt-Liganden wie Wnt-1, Wnt-9b und Wnt-10b die gleichzeitige Anwesenheit von endogenem LRP5 und LRP6 notwendig (Goel et al., 2012). Diese Notwendigkeit wurde aber interessanterweise durch die Überexpression von LRP5 oder LRP6 aufgehoben. In diesem Zusammenhang schlagen die Autoren ein Modell einer zelltypspezifischen Restriktion der Effizienz von Wnt-Liganden vor. Demzufolge könnte ein bezüglich der Konzentration limitiert vorhandener Inhibitor bei einer höheren Rezeptordichte nicht mehr ausreichend mit den Wnt-Liganden um die Bindestellen der Rezeptoren kompetitieren (Goel et al., 2012). Des Weiteren liefert die Studie von Goel et al. einen ersten Hinweis darauf, dass LRP5 und LRP6 sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit eines Wnt-Liganden miteinander interagieren und ein Heterodimer bilden können, was vermutlich die Voraussetzung für die Weiterleitung des Wnt-1-Signals bedingt (Goel et al., 2012).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in dieser Studie das nachfolgende Modell (Abb. F-1) für die Interaktionen der LRPs und die damit verbundene Signalaktivität beschrieben (Goel et al., 2012).

Liegt LRP5 bzw. LRP6 alleine vor (Abb. F-1 links), so unterbindet die Anwesenheit eines Inhibitors, der an PE1-PE2 binden kann, die Ausbildung eines ternären Signalkomplexes mit Fzd und einem Wnt-Liganden wie Wnt-1, der normalerweise mit PE1-PE2 interagiert. Dadurch kann keine Signaltransduktion stattfinden.

Im Gegensatz dazu kann Wnt-3a unter den gleichen Bedingungen eine effiziente Signalweiterleitung induzieren (Abb. F-1 Mitte), da Wnt-3a im Unterschied zu Wnt-1 an PE3-PE4 von LRP6 bindet. Dadurch kann ein ternärer Signalkomplex zwischen Fzd, Wnt-3a und LRP6 (vermutlich auch LRP5) ausgebildet werden, so dass die Anwesenheit eines an PE1-PE2 bindenden Inhibitors in diesem Fall die Wnt-Aktivität nicht unterbinden kann (Goel et al., 2012).

Damit eine Signalweiterleitung über Liganden wie Wnt-1 möglich ist, müssen beide LRP-Rezeptoren (LRP5 und LRP6) vorliegen (Abb. F-1 rechts). Aufgrund der Interaktion von LRP5 und LRP6 entsteht ein Inhibitor-resistentes LRP-Heterodimer, welches für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Inwiefern auch Fzd-Rezeptoren an diesen Komplexen und damit an der Signalweiterleitung beteiligt sind, ist bislang jedoch noch unklar (Goel et al., 2012).

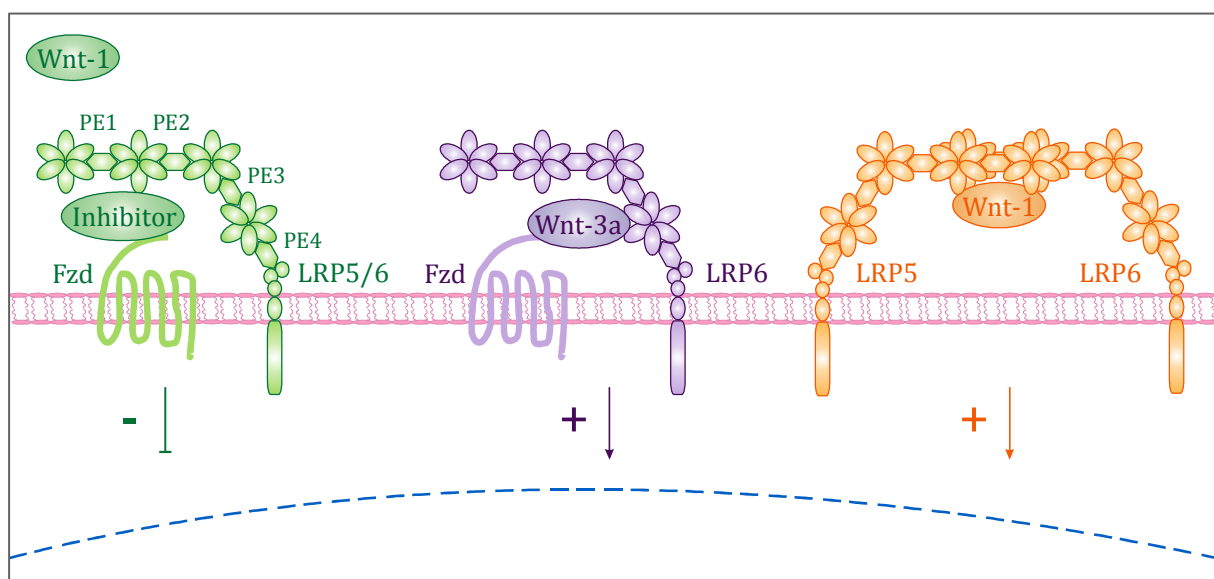


Abb. F-1: Signaltransduktionsaktivität der LRPs in Abhängigkeit von verschiedenen Wnt-Liganden.

Die Anwesenheit eines mit PE1-PE2 interagierenden Inhibitors verhindert die Bildung eines ternären Signalkomplexes mit PE1-PE2-bindenden Liganden wie Wnt-1 (links). Die Signalaktivität von Wnt-3a, das mit PE3-PE4 interagiert, wird durch einen derartigen Inhibitor nicht beeinflusst (Mitte). Durch die Bildung eines Inhibitor-resistenten Heterodimers aus LRP5 und LRP6 kann eine Wnt-1-vermittelte Signaltransduktion stattfinden (rechts). (modifiziert in Anlehnung an Goel et al., 2012)

Ergänzend zu den Auswirkungen auf die Wnt/ β -Catenin-abhängige Signalweiterleitung wurde die Expression des Wnt-Zielgens Axin2 (Jho et al., 2002; Lustig et al., 2002) unter den gleichen experimentellen Bedingungen untersucht. Axin2 gilt als sensibles endogenes Wnt-Zielgen, da sein Promotor 8 TCF/LEF-Bindestellen aufweist, die eine große Ähnlichkeit zu den optimierten Konsensus-Sequenzen etablierter Reportersysteme aufweisen (Chien et al., 2009).

Im Basalzustand war sowohl nach RNAi gegen LRP5 als auch gegen LRP6 eine vergleichbare Abnahme der Axin2-mRNA zu verzeichnen. Dagegen resultierte der Knockdown von LRP5 unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen in keiner transkriptionellen Veränderung von Axin2, während RNAi gegen LRP6 zu einer deutlichen Reduktion der

Expression von Axin2 führte. Die Veränderungen hinsichtlich der Expression von Axin2 korrelierten in sehr hohem Maße mit den entsprechenden Veränderungen der Gaussia Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC nach RNAi gegen die Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6, wodurch die Validität unseres TCF/LEF-Reporter-gen-Systems in hMSC nachhaltig unter Beweis gestellt wird.

Außerdem korrelieren die Veränderungen der Axin2-Expression unter Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen mit Untersuchungen von LRP5- bzw. LRP6-defizienten MEFs, wobei nur die LRP6-defizienten MEFs eine Abnahme der Expression von Axin2 aufwiesen (Goel et al., 2012).

F.2.3 Überexpressionsstudien

Mit dem Ziel, die bisherigen Beobachtungen weiterführend zu analysieren, wurde LRP5 bzw. LRP6 in hMSC überexprimiert, wobei die Überexpression der beiden Wnt-Korezeptoren wiederum auf mRNA- und Proteinebene demonstriert wurde. Der Effekt der Überexpression wurde in Analogie zur RNAi-basierten Analyse unter basalen sowie Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen evaluiert. Während im Basalzustand weder die Überexpression von LRP5 noch von LRP6 einen Einfluss zeigte, führte nach Applikation von Wnt-3a lediglich die Überexpression von LRP6 zu einer deutlich verstärkten β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion, wohingegen die LRP5-Überexpression im direkten Vergleich nur einen geringen Einfluss auf die Signalweiterleitung ausübte. Somit weisen auch diese Daten darauf hin, dass hauptsächlich LRP6 mit Wnt-3a interagieren kann, um die β -Catenin-abhängige Signalkaskade in hMSC zu initiieren.

Zwischenzeitlich konnte eine Studie zeigen, dass zwischen LRP5 und LRP6 zwei bedeutende Hauptunterschiede bestehen (MacDonald et al., 2011). Zum einen besitzt LRP6 ein aktiveres Signalpeptid als LRP5, so dass LRP6 deutlich besser prozessiert und exprimiert wird. Der Austausch des Signalpeptids in LRP5 gegen des Signalpeptid von LRP6 führte zwar zu einer gesteigerten Expression des entsprechenden Proteins (*LRP5), aber nicht zu einer nachhaltig erhöhten Signaltransduktion.

Der zweite Unterschied zwischen LRP5 und LRP6 ist im C-Terminus der Rezeptoren lokalisiert. Dabei handelt es sich um die *intervening region gap4* zwischen den letzten beiden C-terminalen PPPSPxS-Motiven D und E, die dafür verantwortlich ist, dass LRP6 im Vergleich zu LRP5 eine deutlich höhere Fähigkeit zur β -Catenin-vermittelten Signalweiterleitung besitzt. Die *gap4* Region von LRP5 weist die Aminosäuresequenz SYF auf und unterscheidet sich damit deutlich von der SYSH-Sequenz der *gap4* Region von LRP6 (Abb. F-2).

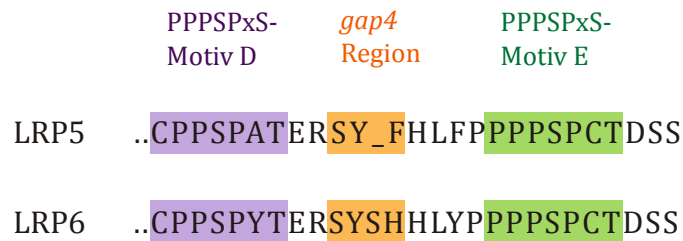


Abb. F-2: C-terminale Sequenz der LRPs mit der *gap4* Region.

Die C-terminale Sequenz von LRP5 und LRP6 unterscheidet sich hauptsächlich in der *gap4* Region, die sich zwischen den beiden letzten C-terminalen PPPSPxS-Motiven D und E der LRPs befindet (MacDonald et al., 2011).

Die Bedeutung des C-Terminus und dabei insbesondere die tragende Rolle der *gap4* Sequenz hinsichtlich der Signaltransduktion wurde mittels chimärer Rezeptoren aus LRP5 und LRP6 eingehend analysiert. Dabei zeigte sich, dass ein LRP5-Rezeptor mit dem Signalpeptid und der intrazellulären Domäne von LRP6 (*LRP5/6C) ein gesteigertes Signalverhalten aufwies, das aber nur unter Wnt-stimulatorischen Bedingungen mit der Signalaktivität des Wildtyp LRP6 vergleichbar war. Im Gegensatz dazu war ein LRP6-Rezeptor, dessen intrazelluläre Domäne gegen die von LRP5 ausgetauscht wurde (LRP6/5C), nicht mehr zur β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion fähig.

Die Generierung weiterer chimärer Rezeptoren, bei denen jeweils eine der vier *gap* Regionen im C-Terminus von LRP6/5C an die Sequenz von LRP6 angeglichen wurde, zeigte, dass nur durch LRP6/5C+*gap4* die Signaltransduktion auf ein vergleichbares Maß mit dem Wildtyp LRP6 gesteigert werden kann. Dagegen führte die Übertragung der anderen drei *gap* Regionen zu keiner Steigerung der Signalaktivität (MacDonald et al., 2011).

Darüber hinaus demonstrierte diese Studie, dass sich die Signaltransduktionskapazität von LRP5 auf ein vergleichbares Level mit LRP6 anheben lässt, wenn LRP5 mit dem Signalpeptid von LRP6 versehen und die Sequenz der *gap4* Region an die von LRP6 angeglichen wird.

Unsere Ergebnisse, die deutlich zeigen, dass LRP6 für die Weiterleitung des Wnt-3a/ β -Catenin-Signals in hMSC verantwortlich ist, stehen im Einklang mit dieser Studie von MacDonald et al., die einen Einblick in wichtige molekulare Unterschiede der beiden Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 bietet.

Die Analyse der transkriptionellen Veränderung des Wnt-Zielgens Axin2 nach Überexpression von LRP5 und LRP6 ergab, dass die LRP5-Überexpression weder unter basalen Bedingungen noch nach Stimulation mit Wnt-3a eine Veränderung der Axin2-mRNA bewirkte. Dagegen resultierte die Überexpression von LRP6 in beiden Fällen in einer gesteigerten Expression von Axin2, so dass auch in den Überexpressionsstudien die Veränderungen der Gaussia Luciferase-Aktivität in TCF/LEF-Reporter-gen-hMSC im Einklang mit der Axin2-Expression stehen.

F.2.4 Rescue der LRP6-Signaltransduktion

Aufgrund der Tatsache, dass der Knockdown von LRP6 in einer beachtlichen Abnahme der Wnt-3a/ β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion resultierte, wohingegen die Überexpression von LRP6 zu einer gesteigerten Signalweiterleitung führte, wurden in LRP6-Knockdown-hMSC Rescue-Experimente durchgeführt. Dabei konnte die β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion nach Applikation von Wnt-3a nur nach Überexpression von LRP6 wiederhergestellt werden, während die Expression der CDS von LRP5 nicht zu einer Wiederherstellung der Signaltransduktion führte. Diese Daten zeigen abermals, dass für die Wnt-3a-vermittelte Signalkaskade in hMSC der Wnt-Korezeptor LRP6 von essenzieller Bedeutung ist.

Darüber hinaus bekräftigen unsere Daten Ergebnisse von Studien mit anderen Zelltypen sowie Tiermodellen, die unterschiedliche Funktionen der Rezeptoren LRP5 und LRP6 im Wnt/ β -Catenin-Signalweg und damit verbundenen Prozessen propagieren (Kato et al., 2002; MacDonald et al., 2011; Pinson et al., 2000; Tamai et al., 2000).

So konnte nachgewiesen werden, dass LRP5-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen postnatal eine verringerte Knockendichte aufweisen, was infolge von verminderter Knochenbildung aufgrund einer reduzierten Osteoblastenproliferation auftritt. Außerdem weisen LRP5^{-/-} Mäuse eine über das Embryonalstadium hinaus persistierende Vaskularisation der Augen auf, da keine Makrophagen-vermittelte Apoptose der Blutgefäße stattfindet (Kato et al., 2002).

LRP6-defiziente Mäuse sind dagegen perinatal letal und weisen Entwicklungsdefekte auf, die denen nach Mutation von Wnt-Liganden wie z.B. Wnt-3a ähnlich sind (Pinson et al., 2000). Zu diesen Defekten zählen neben einer Fehlbildung des Urogenitaltraktes auch eine Verkürzung des Axialskelettes und Missbildungen der Gliedmaßen. Zudem konnte in *Xenopus* gezeigt werden, dass sowohl die Bildung der Sekundärachse als auch die Entstehung der Neuralleiste von LRP6 abhängig ist (Tamai et al., 2000).

Kürzlich wurde zudem eine Studie mit MEFs veröffentlicht, in der gezeigt werden konnte, dass LRP5-defiziente MEFs keine bedeutenden Veränderungen in der Wnt-3a induzierten, β -Catenin vermittelten Signaltransduktion aufweisen (Goel et al., 2012), wohingegen LRP6-defiziente MEFs mit einer starken Reduktion der Signalaktivität assoziiert waren (Kawai et al., 2007), was wiederum im Einklang mit unseren Daten steht.

Zusammenfassend konnte mit den Daten im Hinblick auf die Initiation der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade in hMSC zum ersten Mal gezeigt werden, dass bezüglich LRP5 und LRP6 ausschließlich der Wnt-Korezeptor LRP6 für die Wnt-3a/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion verantwortlich ist.

F.3 Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktion in LRP-hMSC

Vor dem Hintergrund, langfristige Effekte von LRP5 oder LRP6 analysieren zu können, wurden mittels randomisierter sowie ortsspezifischer Integration stabil LRP-exprimierende hMSC generiert und in Bezug auf die Wnt-3a/ β -Catenin-vermittelte Signalweiterleitung untersucht. Allerdings stellten die LRP6-exprimierenden hMSC während der Expansionsphase das Wachstum ein und standen somit nicht für Untersuchungen bezüglich der Signaltransduktion zur Verfügung.

Die verschiedenen, stabil LRP-exprimierenden hMSC-Populationen wiesen deutliche Unterschiede in der Expression des Transgens auf. Diese Tatsache lässt sich analog zur Generierung der TCF/LEF-Reportergen-hMSC damit erklären, dass die Plasmid-DNA an mehreren Stellen in die gDNA integriert wurde (Wurtele et al., 2003) bzw. dass am Integrationsort eine offene Chromatinstruktur vorliegt, die aufgrund der besseren Zugänglichkeit für regulatorische Proteine effizienter abgelesen werden kann (Eberharter and Becker, 2002). Dies spiegelte sich generell sowohl unter basalen als auch Wnt-3a-stimulatorischen Bedingungen in der β -Catenin-vermittelten Signaltransduktion wieder: je höher die LRP5-Expression in den hMSC-Populationen ausfiel, desto höher war auch die Aktivität der Gaussia Luciferase. Die einzige Ausnahme bildete dabei die 320-fach LRP5-überexprimierende Population 2xFlag-LRP5 #1, bei der zwar auch die Reporterprotein-Aktivität durch Wnt-3a-Applikation induzierbar war, jedoch geringer ausfiel als bei den niedriger LRP5-exprimierenden hMSC-Populationen.

Primär widersprechen diese Daten den Ergebnissen aus den transienten Untersuchungen, die eindeutig zeigten, dass LRP6 für die Wnt-3a/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion in hMSC verantwortlich ist, während LRP5 dabei keine Bedeutung zugeschrieben werden konnte. Eine mögliche Erklärung für diese Divergenz könnte darin begründet sein, dass für eine aktivierende Wirkung von LRP5 eine gewisse Rezeptordichte auf der Zelloberfläche erreicht werden muss, welche aufgrund der transienten Expression nicht möglich ist, da die episomal vorliegende Plasmid-DNA durch zelluläre Nukleasen schnell abgebaut wird (Colosimo et al., 2000). Dafür spricht auch, dass die höher LRP5-exprimierenden hMSC-Populationen eine stärkere Reporterprotein-Aktivität auslösen, so dass die Steigerung der Gaussia Luciferase-Aktivität von der Rezeptordichte abhängig zu sein scheint.

Vor Kurzem wurde in diesem Zusammenhang berichtet, dass eine chemisch induzierte Dimerisierung von LRP5 ausreicht, um eine Stabilisierung von β -Catenin zu induzieren (Shahi et al., 2012). Denkbar wäre daher, dass ab einer bestimmten Rezeptordichte eine spontane Dimerisierung von LRP5 aufgrund der räumlichen Nähe begünstigt wird.

Damit eine überschüssige Aktivierung der Signaltransduktion verhindert wird, könnte der LRP5-Rezeptor selbst nach Interaktion mit dem Wnt-3a-Liganden dessen Internalisierung und Degradation vermitteln. Durch einen derartigen Mechanismus könnte die geringe Induktion der Reporterprotein-Aktivität der 320-fach LRP5-überexprimierende Population zumindest partiell erklärt werden.

Tatsächlich ist ein derartiges Szenario für den Hedgehog-Signalweg beschrieben, der ähnlich wie der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung und der Gewebekomöostase sowie bei Tumoren spielt (Jiang and Hui, 2008). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass der Rezeptor Patched nach Bindung des Morphogens Hedgehog zu dessen Internalisierung führt, und somit die Konzentration von Hedgehog herabsetzt (Deneff et al., 2000; Incardona et al., 2000). Die Internalisierung der Patched-Hedgehog-Komplexe scheint zudem von der Konzentration des Rezeptors Patched abhängig zu sein (Chen and Struhl, 1996), so dass eine ähnliche Regulation in Bezug auf die Wnt-3a-vermittelte Signaltransduktion in Betracht gezogen werden kann.

In diesem Kontext wurde beschrieben, dass der Wnt-Korezeptor LRP6 in Abhängigkeit von Wnt-3a internalisiert werden kann und nach wenigen Stunden wieder an der Zelloberfläche vorzufinden ist (Yamamoto et al., 2006). Nach Wnt-3a-Stimulation erfolgt dabei eine Ko-Lokalisierung von LRP6 mit Caveolin, das die Internalisierung von LRP6 vermittelt. Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass Dkk-1 die Internalisierung von LRP6 bewirken kann und somit den β -Catenin-abhängigen Signalweg inhibiert (Yamamoto et al., 2008). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen LRP5 und LRP6 könnte ein ähnlicher Mechanismus auch für LRP5 vorstellbar sein. Generell ist die Internalisierung von Rezeptoren ein wichtiger Mechanismus von Zellen, eine persistierende Aktivierung von Signaltransduktionsprozessen zu verhindern (Di Fiore and De Camilli, 2001; Teis and Huber, 2003).

Neben der Gaussia Luciferase-Aktivität wurde auch die transkriptionelle Veränderung der Wnt-Zielgene Cyclin D1 und MT1-MMP in den verschiedenen LRP-exprimierenden hMSC-Populationen untersucht. Für MT1-MMP konnte weder in den LRP5-hMSC noch in der LRP6-hMSC-Population eine signifikante Veränderung der Expression festgestellt werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass der Promotor von MT1-MMP lediglich eine aktive TCF/LEF-Bindestelle aufweist (Takahashi et al., 2002) und somit durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges keine starken Veränderungen induziert werden können. Im Gegensatz dazu zeigte sich in allen LRP-hMSC eine gesteigerte Expression von Cyclin D1, obwohl auch dessen Promotor lediglich nur über eine TCF/LEF-Bindestelle verfügt (Shtutman et al., 1999). Möglicherweise ist die Chromatinstruktur des Cyclin D1-Promotors in hMSC aber besser für die Transkription zugänglich, wodurch dieser Unterschied erklärbar wäre.

Die transkriptionellen Veränderungen von Cyclin D1 verhielten sich bei den LRP5-hMSC analog zur Induktion der Gaussia Luciferase-Aktivität: ein höheres LRP5-Expressionslevel war mit einer stärkeren Expression von Cyclin D1 assoziiert, wobei wiederum die 320-fach LRP5-überexprimierenden hMSC nur eine geringe Veränderung der Cyclin D1-mRNA aufwiesen. Die 5-fach LRP6-überexprimierende hMSC-Population wies im Vergleich mit den 5-fach LRP5-exprimierenden hMSC eine höhere Expression an Cyclin D1 auf. Auch wenn nur eine LRP6-hMSC-Population untersucht werden konnte, weist auch diese Tatsache darauf hin, dass LRP6 die tragende Funktion bei der Wnt-3a/ β -

Catenin-vermittelten Signaltransduktion in hMSC ausübt, während LRP5 lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

F.4 LRP6 und die Differenzierung von hMSC

Aufgrund der deutlichen Unterschiede in der β -Catenin-abhängigen Signaltransduktion durch die Wnt-Korezeptoren, die auf eine entscheidende Rolle von LRP6 hinwiesen, wurde die physiologische Bedeutung der Anwesenheit bzw. des Fehlens der Wnt-Korezeptoren im Rahmen der Differenzierung von hMSC untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Abwesenheit von LRP6 in hMSC zu deren Differenzierung in die adipogene Richtung führte, was durch eine Akkumulation von Fettvakuolen einhergehend mit einer gesteigerten Expression des adipogenen Transkriptionsfaktors PPAR- γ begleitet war. Durch die Wiedereinführung von LRP6 in diese adipogen differenzierten hMSC nahm die Expression von PPAR- γ wieder ab, während die Wnt-3a/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion dadurch gesteigert werden konnte.

In diesem Zusammenhang wurde veröffentlicht, dass PPAR- γ die Wnt/ β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion während der Adipogenese supprimiert (Moldes et al., 2003). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass nach Abnahme der Expression von PPAR- γ die Wnt-Signaltransduktion wieder zunehmen sollte, was genau unseren Beobachtungen entspricht.

Die Behandlung von LRP-Knockdown-hMSC mit adipogenem Differenzierungsmedium verdeutlichte die Bedeutung des Wnt-Korezeptors LRP6 maßgeblich. Nach Knockdown von LRP6 in Kombination mit adipogenen Zusätzen war eine Akkumulation von Fettvakuolen zu verzeichnen, die sich mittels des Farbstoffes Oil Red O anfärben ließen. Die Extraktion und Quantifizierung des Oil Red O Farbstoffes zeigte, dass LRP6-Knockdown-hMSC wesentlich mehr Fettvakuolen aufwiesen als LRP5-Knockdown-hMSC oder die entsprechenden Kontroll-hMSC. Außerdem war in den mit LRP6-siRNA transfizierten und mit adipogenem Differenzierungsmedium kultivierten hMSC eine gesteigerte Expression von PPAR- γ zu beobachten. Diese Daten weisen eindeutig darauf hin, dass LRP6 im Gegensatz zu LRP5 für die Repression der Differenzierung von hMSC in die adipogene Linie notwendig ist.

Bereits im Jahr 2000 wurde eine Studie veröffentlicht, die die Rolle des Wnt-Signalweges während der Adipogenese näher untersuchte (Ross et al., 2000). Die Wnt-vermittelte Signaltransduktion führte zu einer Inhibition der adipogenen Transkriptionsfaktoren C/EBP α (*CCAAT/enhancer binding protein α*) und PPAR- γ , wodurch ein undifferenzierter Zustand von Präadipozyten aufrechterhalten blieb. Im Gegensatz dazu förderte eine Hemmung der Signaltransduktion durch die Überexpression von Axin bzw. von dominant negativem TCF4 die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten.

Nachfolgende Studien zeigten, dass die Osteogenese (Zhou et al., 2008), Myogenese (Shang et al., 2007a; Shang et al., 2007b) und Chondrogenese (Kirton et al., 2007) durch Wnt-Proteine gefördert werden, wohingegen die Adipogenese (Kennell and

MacDougald, 2005; Shang et al., 2007b) den einzigen mesenchymalen Entwicklungsprozess darstellt, der durch den kanonischen Wnt-Weg inhibiert wird (Laudes, 2011). In diesem Kontext wurde berichtet, dass die Wnt/LRP/ β -Catenin-Signaltransduktion in der Zelllinie 3T3-L1 zu einer Hemmung der Adipogenese führt, indem die gegenseitige Aktivierung von PPAR- γ und C/EBP α inhibiert wird (Kawai et al., 2007). Darüber hinaus konnten die Autoren zeigen, dass LRP6^{-/-} MEFs im Gegensatz zu LRP6^{+/+} MEFs eine gesteigerte Adipogenese aufwiesen. Zudem war die TCF-vermittelte Transkription nach Applikation von Wnt-3a in LRP6-defizienten MEFs im Vergleich zu LRP6^{+/+} MEFs reduziert.

Eine weitere Studie, die sich mit der frühen, humanen Adipogenese beschäftigte, konnte zeigen, dass der natürliche Inhibitor des Wnt-Weges Dkk-1 nach Induktion der Adipogenese von humanen Präadipozyten sekretiert wird und für die darauffolgende Abnahme von β -Catenin verantwortlich ist, wodurch die Adipogenese gefördert wird (Christodoulides et al., 2006). Darüber hinaus findet nach der induzierten Adipogenese eine transiente Herabregulation der Dkk-Rezeptoren LRP5 und LRP6 statt, wodurch möglicherweise die Adipogenese weiter gefördert wird.

Kürzlich wurde berichtet, dass durch Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges in hMSC die Adipogenese inhibiert wird (Shen et al., 2011). Dabei führte der Einsatz des Wnt-Mimetikums SB-216763 zur Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, was mit einer Repression der adipogenen Differenzierung einherging. Weiterhin zeigte diese Studie, dass während der Adipogenese kanonische Wnt-Liganden herabreguliert werden. Außerdem konnten die Autoren nachweisen, dass der inhibitorische Effekt des Wnt/ β -Catenin-Signalweges aufgehoben werden kann, da der Knockdown von β -Catenin zur spontanen Adipogenese führte (Shen et al., 2011).

Diese aufgeführten Studien bekräftigen unsere Beobachtung, dass die LRP6-induzierte, β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion in hMSC für die Repression der adipogenen Differenzierung verantwortlich ist.

G SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten dazu beitragen, einen Einblick in die Funktion der Wnt-Korezeptoren LRP5 und LRP6 bei der Initiation der Signaltransduktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg und der Differenzierung von hMSC zu gewinnen. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass in hMSC der Wnt-Korezeptor LRP6 sowohl für die Wnt-3a-induzierte, β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion als auch für die Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters durch Suppression der adipogenen Differenzierung verantwortlich ist. Darüber hinaus konnte der Nachweis erbracht werden, dass LRP6 in hMSC funktionell nicht durch LRP5 ersetzt werden kann.

Durch diese Ergebnisse eröffnen sich neue Möglichkeiten, über LRP6 mittels spezifischer Pharmaka gezielt die β -Catenin-vermittelte Signaltransduktion zu aktivieren oder zu inhibieren. Von entscheidender Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die Signalfunktion streng durch extrazelluläre Proteine reguliert wird (Williams and Insogna, 2009) und die Ektodomäne von LRP6 über verschiedene Bindestellen für Wnt-Liganden und Dkk-Liganden verfügt (Bourhis et al., 2010; Chen et al., 2011; Cheng et al., 2011; Gong et al., 2010). Somit könnten spezielle Arzneimittel wie beispielsweise *small molecule compounds* oder therapeutische Antikörper entwickelt werden, die spezifisch mit Wnt- oder Dkk-Liganden um die Bindung an LRP6 interferieren, wodurch eine Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ermöglicht werden könnte (Bao et al., 2012).

Ein mögliches Einsatzgebiet könnte dabei die Behandlung koronarer Herzkrankheiten darstellen, die in Verbindung mit dem metabolischen Syndrom und Osteoporose auftreten, und mit einer *loss-of-function* Mutation von LRP6 assoziiert sind (Mani et al., 2007). Das metabolische Syndrom gilt als Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten und ist vor allem durch abdominelle Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Dyslipidämie, Insulinresistenz und Atherosklerose charakterisiert (Miranda et al., 2005).

Die *loss-of-function* Mutation von LRP6 ist in diesem Fall durch eine Aminosäuresubstitution bedingt, bei der das Arginin an der Position 611 der zweiten EGF-ähnlichen Domäne durch ein Cystein ersetzt ist (Mani et al., 2007). Auffallend war dabei, dass LRP6_{R611C} im Vergleich zum Wildtyp LRP6 bei niedrigen Wnt-3a-Konzentrationen eine verminderte Wnt-Signaltransduktion hervorrief, wohingegen die Signalaktivität der beiden Proteine bei höheren Konzentrationen von Wnt-3a vergleichbar ausfiel.

Darüber hinaus ist eine weitere *loss-of-function* Mutation von LRP6 beschrieben worden, die eine verminderte Knochendichte zur Folge hat (Kokubu et al., 2004). Dabei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch an der Position 886, bei der Arginin durch Tryptophan substituiert wird. Dieses Arginin ist zwischen der dritten YWTD- β -Propeller Domäne und dem dritten EGF-ähnlichen Repeat lokalisiert, und befindet sich in der Dkk-Binderegion. Interessanterweise ist dieses Arginin zwischen Proteinen der LRP-Familie in unterschiedlichen Spezies hochkonserviert (Kokubu et al., 2004).

Mittels spezifischer Medikamente könnte eine Regeneration der Knochenmasse unterstützt werden. In diesem Zusammenhang sollten neben dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg auch der Parathormon-Signalweg und mögliche synergetische Effekte der beiden Wege analysiert werden. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass LRP6 mit dem Parathormon-Rezeptor und dem Parathormon einen ternären Komplex ausbildet, was in der Stabilisierung von β -Catenin und dessen Akkumulation in Osteoblasten resultiert, die maßgeblich für die Knochenbildung verantwortlich sind (Wan et al., 2008).

In einer Studie mit monoklonalen Antikörpern gegen die Ektodomäne von LRP6 konnte bei Wnt-aktiven MMTV (*mouse mammary tumor virus*)-Tumoren im Mausmodell gezeigt werden, dass dadurch die Interaktion mit Wnt unterbunden wurde, was zu einer Inhibition des Tumorwachstums führte (Ettenberg et al., 2010). Darüber hinaus konnte durch Knockdown von LRP6 in humanen Brustkrebszellen die Tumorgenese inhibiert werden (Liu et al., 2010). Bei der Inhibition des Wnt-Signalweges in der Therapie LRP6-abhängiger Tumoren müsste daher jedoch bedacht werden, dass eine Modulation der Signalaktivität von LRP6 nicht nur einen Einfluss auf die Tumorgenese ausübt, sondern auch die Eigenschaften von Stammzellen nachhaltig verändern kann. Der Erhalt der Stammzeleigenschaften ist vor allem im Hinblick auf ihr regeneratives Potenzial diverser Gewebe von entscheidender Bedeutung (Mimeault and Batra, 2006).

Generell wäre es im Hinblick auf die Entwicklung spezifischer Medikamente zur Manipulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges interessant zu untersuchen, inwiefern durch Bildung von Signalkomplexen mit Rezeptoren der Fzd-Familie die Signaltransduktion weiter beeinflusst werden kann. Es konnte nämlich nachgewiesen werden, dass LRP6 mit Fzd8 und Wnt-3a einen ternären Signalkomplex bilden kann (Bourhis et al., 2010). Die Identifikation von Signalkomplexen aus LRP6 mit weiteren Fzd-Rezeptoren und Wnt-Liganden könnte zukünftig eine Pharmaka-basierte Manipulation durch Generierung spezifischer Arzneimittel deutlich erleichtern.

H LITERATURVERZEICHNIS

- Adler, P.N. (1992). The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 14, 735-741.
- Adler, P.N. (2002). Planar signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2, 525-535.
- Ahn, V.E., Chu, M.L., Choi, H.J., Tran, D., Abo, A., and Weis, W.I. (2011). Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. *Dev Cell* 21, 862-873.
- Alfaro, M.P., Saraswati, S., and Young, P.P. (2011). Molecular mediators of mesenchymal stem cell biology. *Vitamins and hormones* 87, 39-59.
- Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., *et al.* (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6, e1000029.
- Angers, S., and Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 468-477.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., *et al.* (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell* 8, 376-388.
- Arai, F., and Suda, T. (2008). Quiescent stem cells in the niche. In *StemBook* (Cambridge (MA)).
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3, 683-686.
- Baiguera, S., Jungebluth, P., Mazzanti, B., and Macchiarini, P. (2012). Mesenchymal stromal cells for tissue-engineered tissue and organ replacements. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 25, 369-382.
- Baksh, D., Song, L., and Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine* 8, 301-316.
- Bao, J., Zheng, J.J., and Wu, D. (2012). The structural basis of DKK-mediated inhibition of Wnt/LRP signaling. *Sci Signal* 5, pe22.
- Barolo, S. (2006). Transgenic Wnt/TCF pathway reporters: all you need is Lef? *Oncogene* 25, 7505-7511.
- Bartscherer, K., and Boutros, M. (2008). Regulation of Wnt protein secretion and its role in gradient formation. *EMBO Rep* 9, 977-982.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- Bennett, C.N., Ross, S.E., Longo, K.A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K.W., Harrison, S.D., and MacDougald, O.A. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. *J Biol Chem* 277, 30998-31004.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.

- Bilic, J., Huang, Y.L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C.M., Bienz, M., and Niehrs, C. (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science* 316, 1619-1622.
- Binnerts, M.E., Tomasevic, N., Bright, J.M., Leung, J., Ahn, V.E., Kim, K.A., Zhan, X., Liu, S., Yonkovich, S., Williams, J., *et al.* (2009). The first propeller domain of LRP6 regulates sensitivity to DKK1. *Mol Biol Cell* 20, 3552-3560.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7, 1513-1523.
- Bjorklund, P., Akerstrom, G., and Westin, G. (2007). An LRP5 receptor with internal deletion in hyperparathyroid tumors with implications for deregulated WNT/beta-catenin signaling. *PLoS Med* 4, e328.
- Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J., and Tuan, R.S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 93, 1210-1230.
- Bourhis, E., Tam, C., Franke, Y., Bazan, J.F., Ernst, J., Hwang, J., Costa, M., Cochran, A.G., and Hannoush, R.N. (2010). Reconstitution of a Frizzled8-Wnt3a-LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *J Biol Chem*.
- Bourhis, E., Wang, W., Tam, C., Hwang, J., Zhang, Y., Spittler, D., Huang, O.W., Gong, Y., Estevez, A., Zilberleyb, I., *et al.* (2011). Wnt antagonists bind through a short peptide to the first beta-propeller domain of LRP5/6. *Structure* 19, 1433-1442.
- Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002). High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346, 1513-1521.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *The American journal of pathology* 155, 1033-1038.
- Brown, S.D., Twells, R.C., Hey, P.J., Cox, R.D., Levy, E.R., Soderman, A.R., Metzker, M.L., Caskey, C.T., Todd, J.A., and Hess, J.F. (1998). Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 879-888.
- Buckner, C.D., Epstein, R.B., Rudolph, R.H., Clift, R.A., Storb, R., and Thomas, E.D. (1970). Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood* 35, 741-750.
- Cadigan, K.M., and Liu, Y.I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 119, 395-402.
- Cadigan, K.M., and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11, 3286-3305.
- Cai, J., Weiss, M.L., and Rao, M.S. (2004). In search of "stemness". *Experimental hematology* 32, 585-598.
- Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human gene therapy* 21, 1045-1056.
- Chen, H.J., Lin, C.M., Lin, C.S., Perez-Olle, R., Leung, C.L., and Liem, R.K. (2006). The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes Dev* 20, 1933-1945.
- Chen, S., Bubeck, D., MacDonald, B.T., Liang, W.X., Mao, J.H., Malinauskas, T., Llorca, O., Aricescu, A.R., Siebold, C., He, X., *et al.* (2011). Structural and functional studies of LRP6 ectodomain reveal a platform for Wnt signaling. *Dev Cell* 21, 848-861.

- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J., Ahn, S., Hu, L.A., Miller, W.E., Caron, M.G., Barak, L.S., Nusse, R., and Lefkowitz, R.J. (2003). Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* *301*, 1391-1394.
- Chen, Y., and Struhl, G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* *87*, 553-563.
- Cheng, Z., Biechele, T., Wei, Z., Morrone, S., Moon, R.T., Wang, L., and Xu, W. (2011). Crystal structures of the extracellular domain of LRP6 and its complex with DKK1. *Nature structural & molecular biology* *18*, 1204-1210.
- Chien, A.J., Conrad, W.H., and Moon, R.T. (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol* *129*, 1614-1627.
- Cho, H.H., Kim, Y.J., Kim, S.J., Kim, J.H., Bae, Y.C., Ba, B., and Jung, J.S. (2006). Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue engineering* *12*, 111-121.
- Choumerianou, D.M., Dimitriou, H., and Kalmanti, M. (2008). Stem cells: promises versus limitations. *Tissue engineering Part B, Reviews* *14*, 53-60.
- Christodoulides, C., Laudes, M., Cawthorn, W.P., Schinner, S., Soos, M., O'Rahilly, S., Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2006). The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *J Cell Sci* *119*, 2613-2620.
- Ciavarella, S., Dominici, M., Dammacco, F., and Silvestris, F. (2011). Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy. *Stem Cells Dev* *20*, 1-10.
- Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* *288*, 1660-1663.
- Clevers, H. (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. *Nature genetics* *37*, 1027-1028.
- Colosimo, A., Goncz, K.K., Holmes, A.R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R.W., Bennett, M.J., and Gruenert, D.C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *BioTechniques* *29*, 314-318, 320-312, 324 passim.
- Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., and Prockop, D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3213-3218.
- Colter, D.C., Sekiya, I., and Prockop, D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7841-7845.
- Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* *131*, 5103-5115.
- Cong, F., and Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2882-2887.
- Cox, R.T., Pai, L.M., Kirkpatrick, C., Stein, J., and Peifer, M. (1999). Roles of the C terminus of Armadillo in Wingless signaling in *Drosophila*. *Genetics* *153*, 319-332.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* *119*, 2204-2213.
- Davidson, G., Wu, W., Shen, J., Bilic, J., Fenger, U., Stanek, P., Glinka, A., and Niehrs, C. (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* *438*, 867-872.
- De Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R., and van Blitterswijk, C. (2004a). Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* *34*, 818-826.

- De Boer, J., Wang, H.J., and Van Blitterswijk, C. (2004b). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering* 10, 393-401.
- Denef, N., Neubuser, D., Perez, L., and Cohen, S.M. (2000). Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell* 102, 521-531.
- Denham, M., Conley, B., Olsson, F., Cole, T.J., and Mollard, R. (2005). Stem cells: an overview. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al] *Chapter 23*, Unit 23 21.
- Di Fiore, P.P., and De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell* 106, 1-4.
- Ding, Y., Xi, Y., Chen, T., Wang, J.Y., Tao, D.L., Wu, Z.L., Li, Y.P., Li, C., Zeng, R., and Li, L. (2008). Caprin-2 enhances canonical Wnt signaling through regulating LRP5/6 phosphorylation. *J Cell Biol* 182, 865-872.
- Eberhardter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep* 3, 224-229.
- Egger-Adam, D., and Katanaev, V.L. (2010). The trimeric G protein Go inflicts a double impact on axin in the Wnt/frizzled signaling pathway. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239, 168-183.
- Eleftheriou, A., Yoshida, M., and Henderson, B.R. (2001). Nuclear export of human beta-catenin can occur independent of CRM1 and the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Biol Chem* 276, 25883-25888.
- Etheridge, S.L., Spencer, G.J., Heath, D.J., and Genever, P.G. (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 22, 849-860.
- Ettenberg, S.A., Charlat, O., Daley, M.P., Liu, S., Vincent, K.J., Stuart, D.D., Schuller, A.G., Yuan, J., Ospina, B., Green, J., *et al.* (2010). Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15473-15478.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fagotto, F., Gluck, U., and Gumbiner, B.M. (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 8, 181-190.
- Farmer, S.R. (2005). Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *Int J Obes (Lond)* 29 Suppl 1, S13-16.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3, 393-403.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II, and Petrakova, K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* 16, 381-390.
- Fujino, T., Asaba, H., Kang, M.J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D.H., Ioka, R.X., Ono, M., Tomoyori, H., *et al.* (2003). Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 229-234.
- Gao, C., and Chen, Y.G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22, 717-727.
- Gao, Z.H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A., and Virshup, D.M. (2002). Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1182-1187.

- Gershoni, J.M., and Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Analytical biochemistry* 131, 1-15.
- Giannini, A.L., Vivanco, M., and Kypta, R.M. (2000). alpha-catenin inhibits beta-catenin signaling by preventing formation of a beta-catenin*T-cell factor*DNA complex. *J Biol Chem* 275, 21883-21888.
- Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., *et al.* (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321, 1174-1178.
- Goel, S., Chin, E.N., Fakhraldeen, S.A., Berry, S.M., Beebe, D.J., and Alexander, C.M. (2012). Both LRP5 and LRP6 receptors are required to respond to physiological Wnt ligands in mammary epithelial cells and fibroblasts. *J Biol Chem* 287, 16454-16466.
- Gong, Y., Bourhis, E., Chiu, C., Stawicki, S., DeAlmeida, V.I., Liu, B.Y., Phamluong, K., Cao, T.C., Carano, R.A., Ernst, J.A., *et al.* (2010). Wnt isoform-specific interactions with coreceptor specify inhibition or potentiation of signaling by LRP6 antibodies. *PLoS One* 5, e12682.
- Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., *et al.* (2001). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-523.
- Gonzalez-Sancho, J.M., Aguilera, O., Garcia, J.M., Pendas-Franco, N., Pena, C., Cal, S., Garcia de Herreros, A., Bonilla, F., and Munoz, A. (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24, 1098-1103.
- Gordon, M.D., and Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 281, 22429-22433.
- Gottardi, C.J., and Gumbiner, B.M. (2004). Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167, 339-349.
- Gottardi, C.J., Wong, E., and Gumbiner, B.M. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 153, 1049-1060.
- Graf, T., and Stadtfeld, M. (2008). Heterogeneity of embryonic and adult stem cells. *Cell stem cell* 3, 480-483.
- Gregory, C.A., Gunn, W.G., Reyes, E., Smolarz, A.J., Munoz, J., Spees, J.L., and Prockop, D.J. (2005). How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1049, 97-106.
- Habas, R., and Dawid, I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of biology* 4, 2.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., *et al.* (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.
- He, X., Saint-Jeannet, J.P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I., and Varmus, H. (1997). A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* 275, 1652-1654.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., and Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131, 1663-1677.
- Hedgepeth, C.M., Conrad, L.J., Zhang, J., Huang, H.C., Lee, V.M., and Klein, P.S. (1997). Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. *Developmental biology* 185, 82-91.

- Henderson, B.R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2, 653-660.
- Henderson, B.R., and Fagotto, F. (2002). The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep* 3, 834-839.
- Hendrickx, M., and Leyns, L. (2008). Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Development, growth & differentiation* 50, 229-243.
- Hendriksen, J., Fagotto, F., van der Velde, H., van Schie, M., Noordermeer, J., and Fornerod, M. (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active (beta)-catenin independently of CRM1. *J Cell Biol* 171, 785-797.
- Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- Hey, P.J., Twells, R.C., Phillips, M.S., Yusuke, N., Brown, S.D., Kawaguchi, Y., Cox, R., Guochun, X., Dugan, V., Hammond, H., *et al.* (1998). Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene* 216, 103-111.
- Holmen, S.L., Giambernardi, T.A., Zylstra, C.R., Buckner-Berghuis, B.D., Resau, J.H., Hess, J.F., Glatt, V., Bouxsein, M.L., Ai, M., Warman, M.L., *et al.* (2004). Decreased BMD and limb deformities in mice carrying mutations in both Lrp5 and Lrp6. *J Bone Miner Res* 19, 2033-2040.
- Hoppler, S., and Kavanagh, C.L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 120, 385-393.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395.
- Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Gordon, P.L., Koo, W.W., Fitzpatrick, L.A., Neel, M.D., McCarville, M.E., Orchard, P.J., Pyeritz, R.E., and Brenner, M.K. (2001). Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 97, 1227-1231.
- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F., and Waterman, M.L. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nature genetics* 28, 53-57.
- Hsieh, J.C., Rattner, A., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (1999). Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3546-3551.
- Huang, H., and He, X. (2008). Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol* 20, 119-125.
- Huang, H.C., and Klein, P.S. (2004). The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome biology* 5, 234.
- Hurlstone, A., and Clevers, H. (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J* 21, 2303-2311.
- Incardona, J.P., Lee, J.H., Robertson, C.P., Enga, K., Kapur, R.P., and Roelink, H. (2000). Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12044-12049.
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., Shibuya, H., Moon, R.T., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 23, 131-139.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312.

- Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 847-850.
- Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N., and Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22, 1172-1183.
- Jiang, J., and Hui, C.C. (2008). Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell* 15, 801-812.
- Kamiya, N., Shigemasa, K., and Takagi, M. (2001). Gene expression and immunohistochemical localization of decorin and biglycan in association with early bone formation in the developing mandible. *Journal of oral science* 43, 179-188.
- Katanaev, V.L., Ponzielli, R., Semeriva, M., and Tomlinson, A. (2005). Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in *Drosophila*. *Cell* 120, 111-122.
- Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B.H., Glass, D.A., 2nd, Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.H., Brayton, C.F., *et al.* (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157, 303-314.
- Kawahara, K., Morishita, T., Nakamura, T., Hamada, F., Toyoshima, K., and Akiyama, T. (2000). Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin. *J Biol Chem* 275, 8369-8374.
- Kawai, M., Mushiake, S., Bessho, K., Murakami, M., Namba, N., Kokubu, C., Michigami, T., and Ozono, K. (2007). Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalpha. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 276-282.
- Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell* 10, 709-716.
- Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 4694-4705.
- Kelly, O.G., Pinson, K.I., and Skarnes, W.C. (2004). The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 131, 2803-2815.
- Kemp, K.C., Hows, J., and Donaldson, C. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia & lymphoma* 46, 1531-1544.
- Kennell, J.A., and MacDougald, O.A. (2005). Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 280, 24004-24010.
- Kikuchi, A., Kishida, S., and Yamamoto, H. (2006). Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental & molecular medicine* 38, 1-10.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., and Kishida, S. (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 19, 659-671.
- Kikuchi, A., Yamamoto, H., and Sato, A. (2009). Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol* 19, 119-129.
- Kim, M., Lee, H.C., Tsedensodnom, O., Hartley, R., Lim, Y.S., Yu, E., Merle, P., and Wands, J.R. (2008). Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of hepatology* 48, 780-791.
- Kimelman, D., and Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25, 7482-7491.

- Kimoto, S., Cheng, S.L., Zhang, S.F., and Avioli, L.V. (1994). The effect of glucocorticoid on the synthesis of biglycan and decorin in human osteoblasts and bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 135, 2423-2431.
- Kirikoshi, H., Koike, J., Sagara, N., Saitoh, T., Tokuhara, M., Tanaka, K., Sekihara, H., Hirai, M., and Katoh, M. (2000). Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 8-14.
- Kirikoshi, H., Sagara, N., Koike, J., Tanaka, K., Sekihara, H., Hirai, M., and Katoh, M. (1999). Molecular cloning and characterization of human Frizzled-4 on chromosome 11q14-q21. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 955-961.
- Kirton, J.P., Crofts, N.J., George, S.J., Brennan, K., and Canfield, A.E. (2007). Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circulation research* 101, 581-589.
- Kishida, S., Yamamoto, H., and Kikuchi, A. (2004). Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol Cell Biol* 24, 4487-4501.
- Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 387-398.
- Klenow, H., and Henningsen, I. (1970). Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from Escherichia coli B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65, 168-175.
- Knoblich, J.A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 132, 583-597.
- Koike, J., Takagi, A., Miwa, T., Hirai, M., Terada, M., and Katoh, M. (1999). Molecular cloning of Frizzled-10, a novel member of the Frizzled gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 39-43.
- Kokubu, C., Heinzmann, U., Kokubu, T., Sakai, N., Kubota, T., Kawai, M., Wahl, M.B., Galceran, J., Grosschedl, R., Ozono, K., *et al.* (2004). Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development* 131, 5469-5480.
- Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T., and Kikuchi, A. (2007). Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 12, 521-534.
- Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68-75.
- Korbling, M., and Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med* 349, 570-582.
- Korbling, M., Estrov, Z., and Champlin, R. (2003). Adult stem cells and tissue repair. *Bone marrow transplantation* 32 Suppl 1, S23-24.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S., and Basler, K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109, 47-60.
- Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Krieghoff, E., Behrens, J., and Mayr, B. (2006). Nucleo-cytoplasmic distribution of beta-catenin is regulated by retention. *J Cell Sci* 119, 1453-1463.
- Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., *et al.* (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology* 26, 443-452.

- Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (2000). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701-12711.
- Kurayoshi, M., Yamamoto, H., Izumi, S., and Kikuchi, A. (2007). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *The Biochemical journal* 402, 515-523.
- Kusserow, A., Pang, K., Sturm, C., Hroudá, M., Lentfer, J., Schmidt, H.A., Technau, U., von Haeseler, A., Hobmayer, B., Martindale, M.Q., *et al.* (2005). Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 433, 156-160.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larijani, B., Esfahani, E.N., Amini, P., Nikbin, B., Alimoghaddam, K., Amiri, S., Malekzadeh, R., Yazdi, N.M., Ghodsi, M., Dowlati, Y., *et al.* (2012). Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta medica Iranica* 50, 79-96.
- Laudes, M. (2011). Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *Journal of molecular endocrinology* 46, R65-72.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., *et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell* 8, 106-118.
- Lee, E., Salic, A., Kruger, R., Heinrich, R., and Kirschner, M.W. (2003). The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS biology* 1, E10.
- Leung, J.Y., Kolligs, F.T., Wu, R., Zhai, Y., Kuick, R., Hanash, S., Cho, K.R., and Fearon, E.R. (2002). Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J Biol Chem* 277, 21657-21665.
- Li, F.Q., Singh, A.M., Mofunanya, A., Love, D., Terada, N., Moon, R.T., and Takemaru, K. (2007). Chibby promotes adipocyte differentiation through inhibition of beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 27, 4347-4354.
- Li, Y., and Bu, G. (2004). LRP5, a multifunctional cell surface receptor. *Curr Opin Lipidol* 15, 361-363.
- Ling, L., Nurcombe, V., and Cool, S.M. (2009). Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* 433, 1-7.
- Little, R.D., Carulli, J.P., Del Mastro, R.G., Dupuis, J., Osborne, M., Folz, C., Manning, S.P., Swain, P.M., Zhao, S.C., Eustace, B., *et al.* (2002). A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet* 70, 11-19.
- Liu, C.C., Pearson, C., and Bu, G. (2009). Cooperative folding and ligand-binding properties of LRP6 beta-propeller domains. *J Biol Chem* 284, 15299-15307.
- Liu, C.C., Prior, J., Piwnicka-Worms, D., and Bu, G. (2010). LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Liu, G., Bafico, A., Harris, V.K., and Aaronson, S.A. (2003). A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor. *Mol Cell Biol* 23, 5825-5835.
- Liu, W., Singh, R., Choi, C.S., Lee, H.Y., Keramati, A.R., Samuel, V.T., Lifton, R.P., Shulman, G.I., and Mani, A. (2012). Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 6 (LRP6) regulates body fat and glucose homeostasis by modulating nutrient sensing pathways and mitochondrial energy expenditure. *J Biol Chem* 287, 7213-7223.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.

- Lunn, J.S., Sakowski, S.A., Hur, J., and Feldman, E.L. (2011). Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Annals of neurology* 70, 353-361.
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B.A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Yost, H.J., and Virshup, D.M. (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *EMBO J* 26, 1511-1521.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., *et al.* (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 22, 1184-1193.
- Lyons, J.P., Mueller, U.W., Ji, H., Everett, C., Fang, X., Hsieh, J.C., Barth, A.M., and McCrea, P.D. (2004). Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* 298, 369-387.
- Macchiarini, P., Jungebluth, P., Go, T., Asnaghi, M.A., Rees, L.E., Cogan, T.A., Dodson, A., Martorell, J., Bellini, S., Parnigotto, P.P., *et al.* (2008). Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372, 2023-2030.
- MacDonald, B.T., Semenov, M.V., Huang, H., and He, X. (2011). Dissecting molecular differences between Wnt coreceptors LRP5 and LRP6. *PLoS One* 6, e23537.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 17, 9-26.
- MacDonald, B.T., Yokota, C., Tamai, K., Zeng, X., and He, X. (2008). Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *J Biol Chem* 283, 16115-16123.
- Malbon, C.C. (2004). Frizzleds: new members of the superfamily of G-protein-coupled receptors. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 9, 1048-1058.
- Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H., Mani, M.A., Nelson-Williams, C., Carew, K.S., Mane, S., Najmabadi, H., Wu, D., and Lifton, R.P. (2007). LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science* 315, 1278-1282.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., *et al.* (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 417, 664-667.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr, G.H., 3rd, Flynn, C., Yuan, H., Takada, S., Kimelman, D., Li, L., *et al.* (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 7, 801-809.
- Martin-Rendon, E., and Watt, S.M. (2003). Stem cell plasticity. *British journal of haematology* 122, 877-891.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Medina, A., Reintsch, W., and Steinbeisser, H. (2000). Xenopus frizzled 7 can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mechanisms of development* 92, 227-237.
- Mets, T., and Verdonk, G. (1981). In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mechanisms of ageing and development* 16, 81-89.
- Meyer, P. (2000). Transcriptional transgene silencing and chromatin components. *Plant molecular biology* 43, 221-234.
- Mezey, E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki, R.A., and McKercher, S.R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.

- Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J.P., Chatterjee, V.K., Glass, C.K., Gonzalez, F.J., Grimaldi, P.A., Kadowaki, T., Lazar, M.A., O'Rahilly, S., *et al.* (2006). International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacological reviews* 58, 726-741.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS biology* 4, e115.
- Miller, J.R. (2002). The Wnts. *Genome biology* 3, REVIEWS3001.
- Mimeault, M., and Batra, S.K. (2006). Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 24, 2319-2345.
- Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M., and Guyton, J.R. (2005). Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal* 149, 33-45.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5807-5812.
- Moldes, M., Zuo, Y., Morrison, R.F., Silva, D., Park, B.H., Liu, J., and Farmer, S.R. (2003). Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *The Biochemical journal* 376, 607-613.
- Moon, R.T. (2011). Wnt direct target genes (Genes) in Wnt/beta-catenin Pathway. *Sci Signal*.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068-1074.
- Morrison, S.J., Shah, N.M., and Anderson, D.J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 26, 101-106.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483-1487.
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., and Ries, C. (2006). Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1892-1903.
- Neth, P., Ries, C., Karow, M., Egea, V., Ilmer, M., and Jochum, M. (2007). The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev* 3, 18-29.
- Niehrs, C. (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469-7481.
- Niehrs, C., and Shen, J. (2010). Regulation of Lrp6 phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*.
- Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., and Akiyama, T. (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23, 8520-8526.
- Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., and Silberstein, L.E. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 126-131.
- Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res* 18, 523-527.
- Nusse, R., and Varmus, H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.
- Okoye, U.C., Malbon, C.C., and Wang, H.Y. (2008). Wnt and Frizzled RNA expression in human mesenchymal and embryonic (H7) stem cells. *J Mol Signal* 3, 16.

- Pan, W., Choi, S.C., Wang, H., Qin, Y., Volpicelli-Daley, L., Swan, L., Lucast, L., Khoo, C., Zhang, X., Li, L., *et al.* (2008). Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation. *Science* **321**, 1350-1353.
- Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141-146.
- Perdigoto, C.N., and Bardin, A. (2012). Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim Biophys Acta*.
- Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* **11**, 601-612.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J., and Skarnes, W.C. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**, 535-538.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
- Pittenger, M.F., and Marshak, D.R. (2001). Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. In *Stem cell biology*, D.R. Marshak, R.L. Gardner, and D. Gottlieb, eds. (New York: John Inglis), pp. 349-374.
- Polakis, P. (1999). The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 15-21.
- Polakis, P. (2002). Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr Biol* **12**, R499-R501.
- Prestwich, T.C., and Macdougald, O.A. (2007). Wnt/beta-catenin signaling in adipogenesis and metabolism. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 612-617.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74.
- Ramiya, V.K., Maraist, M., Arfors, K.E., Schatz, D.A., Peck, A.B., and Cornelius, J.G. (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature medicine* **6**, 278-282.
- Recillas-Targa, F. (2006). Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular biotechnology* **34**, 337-354.
- Regimbald-Dumas, Y., and He, X. (2011). Wnt signalling: What The X@# is WTX? *EMBO J* **30**, 1415-1417.
- Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409-414.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology* **22**, 326-330.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649-657.
- Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H. (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* **285**, 1923-1926.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**, 1293-1307.

- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F., and Bienz, M. (2000). The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature* 406, 1009-1012.
- Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., and MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.
- Rulifson, E.J., Wu, C.H., and Nusse, R. (2000). Pathway specificity by the bifunctional receptor frizzled is determined by affinity for wingless. *Mol Cell* 6, 117-126.
- Russell, K.C., Lacey, M.R., Gilliam, J.K., Tucker, H.A., Phinney, D.G., and O'Connor, K.C. (2011). Clonal analysis of the proliferation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells as a function of potency. *Biotechnology and bioengineering* 108, 2716-2726.
- Sagara, N., Toda, G., Hirai, M., Terada, M., and Katoh, M. (1998). Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human frizzled-1, frizzled-2, and frizzled-7. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 117-122.
- Saitoh, T., Hirai, M., and Katoh, M. (2001a). Molecular cloning and characterization of human Frizzled-5 gene on chromosome 2q33.3-q34 region. *International journal of oncology* 19, 105-110.
- Saitoh, T., Hirai, M., and Katoh, M. (2001b). Molecular cloning and characterization of human Frizzled-8 gene on chromosome 10p11.2. *International journal of oncology* 18, 991-996.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., and Kikuchi, A. (2010). Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J* 29, 41-54.
- Scholer, H.R. (2004). [The potential of stem cells. A status update]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 47, 565-577.
- Schulte, G. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacological reviews* 62, 632-667.
- Schulte, G., and Bryja, V. (2007). The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28, 518-525.
- Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-720.
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P.J., Kikuchi, A., Higuchi, Y., and Bienz, M. (2007a). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nature structural & molecular biology* 14, 484-492.
- Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C., and Bienz, M. (2007b). Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 120, 2402-2412.
- Schweizer, L., and Varmus, H. (2003). Wnt/Wingless signaling through beta-catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biol* 4, 4.
- Segditsas, S., and Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531-7537.
- Seifert, J.R., and Mlodzik, M. (2007). Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 8, 126-138.
- Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., and Prockop, D.J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 20, 530-541.
- Semenov, M.V., Habas, R., Macdonald, B.T., and He, X. (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* 131, 1378.

- Semenov, M.V., Tamai, K., Brott, B.K., Kuhl, M., Sokol, S., and He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11, 951-961.
- Shahi, P., Park, D., Pond, A.C., Seethammagari, M., Chiou, S.H., Cho, K., Carstens, J.L., Decker, W.K., McCrea, P.D., Ittmann, M.M., *et al.* (2012). Activation of Wnt signaling by chemically induced dimerization of LRP5 disrupts cellular homeostasis. *PLoS One* 7, e30814.
- Shang, Y.C., Wang, S.H., Xiong, F., Zhao, C.P., Peng, F.N., Feng, S.W., Li, M.S., Li, Y., and Zhang, C. (2007a). Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1761-1774.
- Shang, Y.C., Zhang, C., Wang, S.H., Xiong, F., Zhao, C.P., Peng, F.N., Feng, S.W., Yu, M.J., Li, M.S., and Zhang, Y.N. (2007b). Activated beta-catenin induces myogenesis and inhibits adipogenesis in BM-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 9, 667-681.
- Shen, L., Glowacki, J., and Zhou, S. (2011). Inhibition of adipocytogenesis by canonical WNT signaling in human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 317, 1796-1803.
- Shi, Y., Desponts, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell stem cell* 3, 568-574.
- Shimizu, H., Julius, M.A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A.M., and Kitajewski, J. (1997). Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 8, 1349-1358.
- Shitashige, M., Hirohashi, S., and Yamada, T. (2008). Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer science* 99, 631-637.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522-5527.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.
- Stambolic, V., Ruel, L., and Woodgett, J.R. (1996). Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6, 1664-1668.
- Swiatek, W., Kang, H., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Coombs, G.S., Hunt, D.F., and Virshup, D.M. (2006). Negative regulation of LRP6 function by casein kinase I epsilon phosphorylation. *J Biol Chem* 281, 12233-12241.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell* 11, 791-801.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi, M., Tsunoda, T., Seiki, M., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2002). Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* 21, 5861-5867.
- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., and He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.

- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., and He, X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13, 149-156.
- Tanneberger, K., Pfister, A.S., Brauburger, K., Schneikert, J., Hadjihannas, M.V., Kriz, V., Schulte, G., Bryja, V., and Behrens, J. (2011). Amer1/WTX couples Wnt-induced formation of PtdIns(4,5)P₂ to LRP6 phosphorylation. *EMBO J* 30, 1433-1443.
- Tannous, B.A. (2009). Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. *Nature protocols* 4, 582-591.
- Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 11, 435-443.
- Teis, D., and Huber, L.A. (2003). The odd couple: signal transduction and endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 60, 2020-2033.
- Thompson, B., Townsley, F., Rosin-Arbesfeld, R., Musisi, H., and Bienz, M. (2002). A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 367-373.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Tokuhara, M., Hirai, M., Atomi, Y., Terada, M., and Katoh, M. (1998). Molecular cloning of human Frizzled-6. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 622-627.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B.M. (1995). Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5, 571-576.
- Toomes, C., Bottomley, H.M., Jackson, R.M., Towns, K.V., Scott, S., Mackey, D.A., Craig, J.E., Jiang, L., Yang, Z., Trembath, R., *et al.* (2004). Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am J Hum Genet* 74, 721-730.
- Torres, M.A., Yang-Snyder, J.A., Purcell, S.M., DeMarais, A.A., McGrew, L.L., and Moon, R.T. (1996). Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol* 133, 1123-1137.
- Trounson, A., Thakar, R.G., Lomax, G., and Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC medicine* 9, 52.
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A.S., Kaushal, C., and Sharma, S. (2011). The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research* 2, 236-240.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-736.
- van Amerongen, R., Mikels, A., and Nusse, R. (2008). Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal* 1, re9.
- van Beest, M., Dooijes, D., van De Wetering, M., Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O., and Clevers, H. (2000). Sequence-specific high mobility group box factors recognize 10-12-base pair minor groove motifs. *J Biol Chem* 275, 27266-27273.
- Venkataramana, N.K., Kumar, S.K., Balaraju, S., Radhakrishnan, R.C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D.K., Das, M., Jan, M., Gupta, P.K., *et al.* (2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 155, 62-70.
- Verhaegent, M., and Christopoulos, T.K. (2002). Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. *Analytical chemistry* 74, 4378-4385.

- Verkaar, F., van Rosmalen, J.W., Smits, J.F., Blankesteyn, W.M., and Zaman, G.J. (2009). Stably overexpressed human Frizzled-2 signals through the beta-catenin pathway and does not activate Ca²⁺-mobilization in Human Embryonic Kidney 293 cells. *Cell Signal* 21, 22-33.
- Vlad, A., Rohrs, S., Klein-Hitpass, L., and Muller, O. (2008). The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* 20, 795-802.
- Waddington, R.J., Roberts, H.C., Sugars, R.V., and Schonherr, E. (2003). Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *European cells & materials* 6, 12-21; discussion 21.
- Wan, M., Yang, C., Li, J., Wu, X., Yuan, H., Ma, H., He, X., Nie, S., Chang, C., and Cao, X. (2008). Parathyroid hormone signaling through low-density lipoprotein-related protein 6. *Genes Dev* 22, 2968-2979.
- Wang, H.Y., Liu, T., and Malbon, C.C. (2006). Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal* 18, 934-941.
- Wang, Y.K., Samos, C.H., Peoples, R., Perez-Jurado, L.A., Nusse, R., and Francke, U. (1997). A novel human homologue of the *Drosophila* frizzled wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Human molecular genetics* 6, 465-472.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., *et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell* 7, 618-630.
- Watabe, T., and Miyazono, K. (2009). Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* 19, 103-115.
- Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.
- Wiechens, N., and Fagotto, F. (2001). CRM1- and Ran-independent nuclear export of beta-catenin. *Curr Biol* 11, 18-27.
- Willert, J., Epping, M., Pollack, J.R., Brown, P.O., and Nusse, R. (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC developmental biology* 2, 8.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
- Willert, K., and Jones, K.A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 20, 1394-1404.
- Willert, K., and Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 8, 95-102.
- Williams, B.O., and Insogna, K.L. (2009). Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res* 24, 171-178.
- Wolf, J., Palmby, T.R., Gavard, J., Williams, B.O., and Gutkind, J.S. (2008). Multiple PPPS/TP motifs act in a combinatorial fashion to transduce Wnt signaling through LRP6. *FEBS Lett* 582, 255-261.
- Wong, G.T., Gavin, B.J., and McMahon, A.P. (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278-6286.
- Wurtele, H., Little, K.C., and Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene therapy* 10, 1791-1799.
- Yamamoto, H., Komekado, H., and Kikuchi, A. (2006). Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Dev Cell* 11, 213-223.

- Yamamoto, H., Sakane, H., Michiue, T., and Kikuchi, A. (2008). Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling. *Dev Cell* 15, 37-48.
- Yokoya, F., Imamoto, N., Tachibana, T., and Yoneda, Y. (1999). beta-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner. *Mol Biol Cell* 10, 1119-1131.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yum, S., Lee, S.J., Piao, S., Xu, Y., Jung, J., Jung, Y., Oh, S., Lee, J., Park, B.J., and Ha, N.C. (2009). The role of the Ser/Thr cluster in the phosphorylation of PPPSP motifs in Wnt coreceptors. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 345-349.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., *et al.* (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367-375.
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., Okamura, H., Woodgett, J., and He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438, 873-877.
- Zhou, H., Mak, W., Zheng, Y., Dunstan, C.R., and Seibel, M.J. (2008). Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem* 283, 1936-1945.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* 4, 381-384.
- Ziegler, S., Rohrs, S., Tickenbrock, L., Moroy, T., Klein-Hitpass, L., Vetter, I.R., and Muller, O. (2005). Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation. *The FEBS journal* 272, 1600-1615.

I DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all den Menschen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Für die Vertretung meiner Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München möchte ich Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar, Inhaberin des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, ganz herzlich danken.

Frau Amelie von Thielmann, Sekretärin von Frau Prof. Angelika Vollmar, danke ich für Ihre Unterstützung bei allen Fragen rund um meine externe Promotion.

Frau Prof. Dr. Marianne Jochum, ehemalige Leiterin der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie am Klinikum der LMU München, hat mir die Durchführung meiner Promotion an Ihrem Institut ermöglicht. Dafür möchte ich Ihr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Christian Weber, Direktor des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankheiten, danke ich dafür, dass ich meine Promotion nach Eingliederung der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Peter Neth in sein Institut dort weiterführen und abschliessen konnte.

Inbesondere danke ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. Peter Neth, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mich durch die Höhen und Tiefen einer Doktorarbeit geführt hat. Dabei hatte er stets einen fachlichen Rat zur Hand und hat mich auch in schwierigen Phasen motiviert.

Lourdes Ruiz-Heinrich und Claudia Geißler danke ich für Ihre Unterstützung im Laboralltag.

Dr. Marisa Karow danke ich für die Einarbeitung in die Arbeiten mit hMSC und für Ihre fachliche Unterstützung.

Prof. Dr. Christian Sommerhoff danke ich für seine konstruktiven Vorschläge im Rahmen des Abteilungsseminars und unsere persönlichen Gespräche.

Prof. Dr. Hans Fritz danke ich für seine liebenswerte und offene Art, mit der er das gemütliche Beisammensein an den Abenden in Tiers stets verschönert hat.

Den ehemaligen und jetzigen Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe Neth danke ich für eine schöne und auch lustige Zeit im Labor:

Dr. Marisa Karow, Ulrike Leitenstern, Felix Lechner, Wenzel Schicho und Tobias Greve. Besonders bedanken möchte ich mich bei Simon Capovilla, der mir stets mit Rat zur Seite stand, und bei Raphael Metzler, der mich ebenfalls unterstützt und mit seiner fröhlichen Art für ein gutes Arbeitsklima gesorgt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei folgenden ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen für ein freundlich-nettes Umfeld und ihre Unterstützung bedanken:

Prof. Dr. Edwin Fink, PD Dr. Alexander Faußner, PD Dr. Christian Ries, PD Dr. Dorit Nägler, Dr. Tanja Popp, Dr. Virginia Egea, Thomas Pitsch, Steffen Kraus, Larisa Ring, Jasmin Leschner, Maresa Grundhuber, Christian Mahl, Janina Deppe sowie allen hier nicht genannten Mitgliedern der ehemaligen Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie.

Evelyn Themel und Karola Rügamer-Biese danke ich für die tatkräftige Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten und ihre fröhliche Stimmung im Sekretariat, die einen immer zu einem kurzen Verweilen einlud.

In Luisa-Astrid Fratila habe ich nicht nur eine nette Kollegin, sondern vor allem eine Freundin gefunden.

Barbara Berschneider danke ich nicht nur für unsere Freundschaft, sondern auch für ihr stets offenes Ohr in sämtlichen Forschungsangelegenheiten sowie für ihre fachlichen Ratschläge.

Ein herzlicher Dank gebührt meinen Eltern, Charlotte und Helmut Peröbner, die mir meinen bisherigen Lebensweg von der Schule über das Studium bis hin zur Promotion ermöglicht haben. Sie hatten dabei immer ein offenes Ohr für mich und haben mich durch viele schöne sowie manchmal auch schwierige Zeiten begleitet.

Besonders dankbar bin ich meinem Papa dafür, dass er mich gelehrt hat, Herausforderungen anzunehmen, sie zielgerichtet anzugehen, auch in schwierigen Zeiten nicht einfach aufzugeben, sondern sich voller Energie einzusetzen und immer das bestmögliche zu geben.

Auch der Familie Pielmeier möchte ich ganz herzlich danken. Sie alle haben mich so liebevoll bei sich aufgenommen und mir durch ihre Wärme immer wieder neue Kraft gegeben.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Verlobten, Markus Pielmeier, der mir stets eine starke Schulter zum Anlehnen bot und immer für mich da war. Mit seiner scheinbar endlosen Geduld, seinem großen Verständnis und nicht zuletzt seiner liebenswerten und gefühlvollen Art hat er zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen.